BESTIMMUNG VON EXTRAKTEN AUS ÄTHERISCHEN ÖLDROGEN MITTELS DC/HPLC

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Eberhard Bock
aus Göppingen

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547608_0031

BESTIMMUNG VON EXTRAKTEN AUS ÄTHERISCHEN ÖLDROGEN MITTELS DC/HPLC

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Eberhard Bock
aus Göppingen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Februar 1983

Dekan: Professor Dr. J. Strähle

1. Berichterstatter: Professor Dr. K.-A. Kovar

2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Reinhard

Die vorliegende Arbeit wurde im Januar 1980 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. K.-A. Kovar am Pharmazeutischen Institut der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen begonnen und im November 1982 abgeschlossen.

Herrn Prof. Dr. K.-A. Kovar danke ich für die Überlassung des Themas sowie für seine wertvollen Anregungen und freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	EINLEITUNG	1
2	DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE CHARAKTERISIERUNG	2
2.1	Voruntersuchungen	2
2.2	Vereinheitlichung der DC-Systeme	15
2.3	Dünnschichtchromatographische Charakterisierung nach Wasserdampfdestillation	21
2.4	Übersichts-Dünnschichtchromatogramm eines Extraktgemisches	31
3	HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN	34
3.1	Trennung mit Methanol-Wasser	35
3.1.1	Fluidextraktmischung auf RP 8	35
3.1.2	Fluidextraktmischung auf RP 18	38
3.1.3	Spissumextraktmischung auf RP 8	41
3.1.4	Spissumextraktmischung auf RP 18	45
3.2	Trennung mit Acetonitril-Wasser	48
3.2.1	Fluidextraktmischung auf RP 8	48
3.2.2	Fluidextraktmischung auf RP 18	52
3.2.3	Spissumextraktmischung auf RP 8	55
3.2.4	Spissumextraktmischung auf RP 18	57
3.3	Quantitative Bestimmungen	60
4	ZUSAMMENFASSUNG	65
5	EXPERIMENTELLER TEIL	67
6	LITERATURVERZEICHNIS	107

1 EINLEITUNG

Terpenhaltige Pflanzenextrakte werden oft als Bestandteile von Pharmazeutischen Zubereitungen angetroffen. Für die Qualitätsbeurteilung von Einzelextrakten und deren Mischungen in Arzneimitteln ist eine Analytik erforderlich, die eine schnelle Identifizierung und Charakterisierung ermöglicht.

Kovar und Friess[1,2] führten eine vergleichende Bestimmung von ätherischen Ölen in Gemischen mittels Gaschromatographie (GC) und Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) durch. Sie zeigten, daß beide Verfahren geeignet sind, aber in verschiedenen Fällen verwendet werden sollten. Die HPLC wird man bei ätherischen Ölen mit gut UV-absorbierenden Verbindungen wegen der vollständigen Trennung und aus Zeitersparnisgründen bevorzugen; die GC bietet sich dagegen bei Mischungen mit unspezifisch detektierbaren Komponenten an. Kovar und Sakmann[3,4] übertrugen diese Vorarbeiten auf die Bestimmung von Ölmischungen in Salben, wobei sie wegen anschließender Stabilitätsuntersuchungen der GC den Vorzug gaben. Da eine Trennung der ätherischen Öle von der Salbengrundlage aus mehreren Gründen notwendig war, wählten sie zur Probenvorbereitung eine leicht modifizierte Wasserdampfdestillation mit der Spezialapparatur nach Ph.Eur.III. In diesem Zusammenhang interessierte die Frage, inwieweit sich die HPLC zu quantitativen Bestimmungen von Extrakten aus ätherischen Öldrogen heranziehen läßt, zumal Veröffentlichungen zu diesem Gebiet bisher nicht bekannt sind. Ziel dieser Arbeit ist daher, solche Extrakte, die sowohl sauerstofffreie als auch sauerstoffhaltige Terpene enthalten, einzeln und in Mischung chromatographisch (DC/HPLC) zu untersuchen.

Dazu wurden folgende Fluid- und Spissumextrakte ausgewählt: Anis-, Baldrian-, Fenchel-, Kamillen-, Kümmel-, Liebstöckel- und Wacholder-Fluidextrakt, Melissen- und Pfefferminz-Spissumextrakt.

2 DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE CHARAKTERISIERUNG*)

2.1 Voruntersuchungen

Es war die Absicht der dc Untersuchungen, durch Vergleichssubstanzen einen Teil der Inhaltsstoffe zu identifizieren. Desweiteren kann anhand von Vergleichsstoffen eine halbquantitative Aussage über das Vorkommen einiger Inhaltsstoffe in den Extrakten gemacht werden. Für diese Untersuchungen wurden die Vorschriften herangezogen[5-9], in denen die Drogen verzeichnet sind, aus welchen die Extrakte hergestellt sind.

(1) Anis-Fluidextrakt

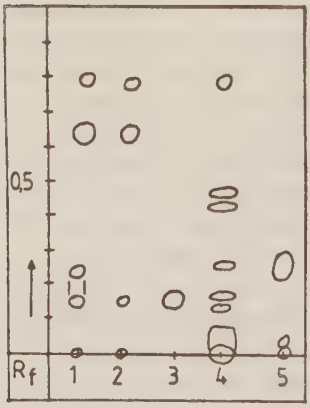


Abb. 1:
DC Anis-Fluidextrakt
Fm: Benzol, Detektion: Molybdatophosphorsäure
1 Vergleichsdroge
2 Anethol
3 Anisaldehyd
4 Extrakt
5 Ol. Olivarum

*) Chromatographische Daten und Bedingungen sowie Probenvorbereitung s. Experimenteller Teil.

Auswertung:

Im Extrakt ist kein Anethol und kein Anisaldehyd nachweisbar. Bei R_f 0,15 ist allerdings eine blaue Färbung detektierbar, die aber nicht mit Anisaldehyd identisch sein kann, da Anisaldehyd mit Molybdatophosphorsäure eine orange Färbung gibt.

(2) Badrian-Fluidextrakt

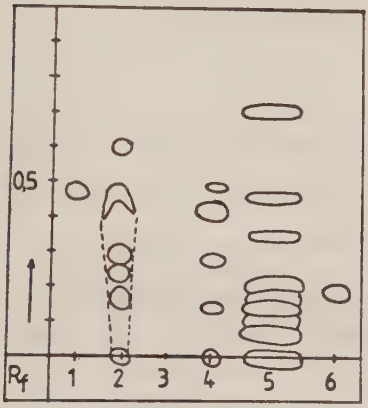


Abb. 2:
DC Baldrian-Fluidextrakt
Fm: Hexan + Ethylmethylketon = 80 + 20,
Detektion: DNPH
1 Anisaldehyd
2 Valmane^R
3 Isovaleriansäure
4 Vergleichsdroge
5 Extrakt
6 Vanillin

Auswertung:

Bei R_f 0,47 ist kein Valtrat zu erkennen. Es treten bei R_f 0,08, 0,12 und 0,17 hellbraune Flecken auf; bei R_f 0,21 ein dunkelbrauner Fleck und bei R_f 0,7 ein schwach hellbrauner Fleck.

Nach Untersuchungen von Stahl/Schild[10], Kuhlhanek et al.[11] und Graf/Bornkessel[12] sind in Baldrianzubereitungen, die wäßrig oder alkoholisch/wäßrig hergestellt werden, keine Valepotriate zu erwarten.

(3) Fenchel-Fluidextrakt

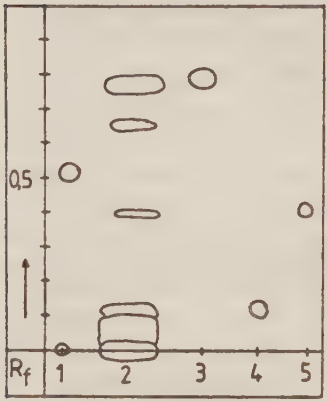


Abb. 3:
DC Fenchel-Fluidextrakt
Fm: Dichlormethan, Detektion: Molybdatophosphorsäure
1 Ol. Olivarum
2 Extrakt
3 Anethol
4 Fenchon
5 Anisaldehyd

Auswertung:

Sehr gut zu erkennen ist Anethol bei R_f 0,76. Schwach lassen sich Anisaldehyd (R_f 0,41) und Fenchon (R_f 0,12) detektieren.

(4) Kamillen-Fluidextrakt

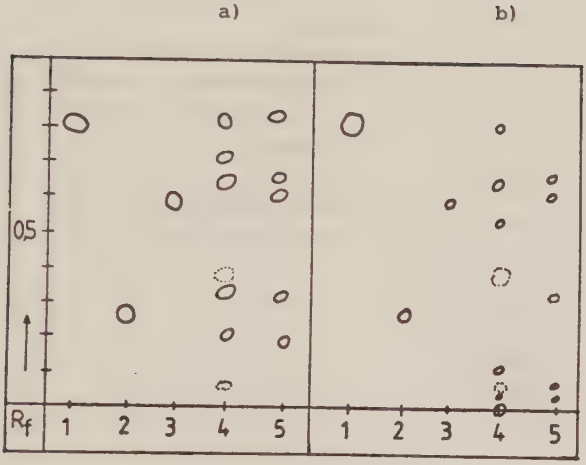


Abb. 4: DC Kamillen-Fluidextrakt
Fm: Chloroform + Benzol = 75 + 25,
Detektion: a) $UV_{254/365}$ (—/-.-) und
b) Anisaldehyd und UV_{365} (....)

1 Guajazulen
2 Borneol
3 Bornylacetat
4 Extrakt
5 Vergleichsdroge

Auswertung:

Gut zu erkennen ist Guajazulen bei R_f 0,8, das beim Extrakt und bei der Vergleichsdroge blau erscheint (Chamazulen). Beim Extrakt tritt bei R_f 0,62 eine braune Färbung auf, bei R_f 0,32 eine blaue und bei R_f 0,2 eine grüngelbe. Ferner kann bei R_f 0,52 eine schwache braune Färbung detektiert werden. Diese kann dem En-In-Dicycloether zugeordnet werden. Bei R_f 0,38 erscheint eine blaue Fluoreszenz, die sich dem Herniarin zuordnen läßt.

(5) Kümmel-Fluidextrakt

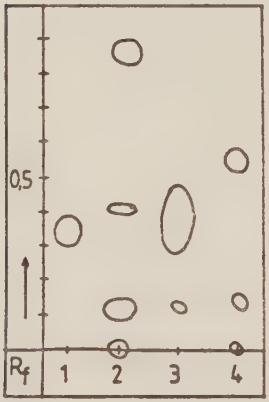


Abb. 5:
DC Kümmel-Fluidextrakt
Fm: Dichlormethan, Detektion: Molybdatophosphorsäure
1 Carvon
2 Extrakt
3 Vergleichsdroge
4 Ol. Olivarum

Auswertung:

Im Extrakt ist schwach noch Carvon zu erkennen. Gut nachweisbar ist fettes Öl und bei R_f 0,85 Limonen.

(6) Liebstöckel-Fluidextrakt

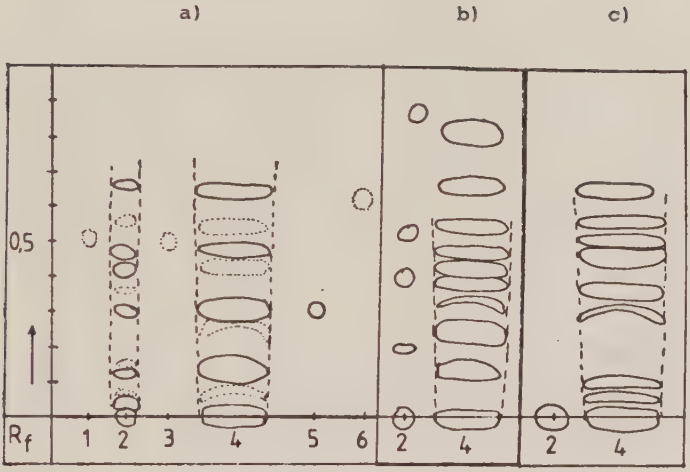


Abb. 6: DC Liebstöckel-Fluidextrakt (nach DAB 7/DDR[7])
Fm: Oberphase aus Benzol + Diethylether + 2N-Essigsäure = 50 + 50 + 20,
Detektion: a) $UV_{254/365}$ (..../—),
b) Antimon(III)-chlorid und UV_{365}
und c) ethanol. KOH und UV_{365}

1 Cumarin
2 Vergleichsdroge
3 Phthalid
4 Extrakt
5 Umbelliferon
6 Phthalsäurediethylester

Auswertung:

Bei der Detektion im UV 254 nm und 365 nm ist gut Umbelliferon (R_f 0,32) zu erkennen (Fluoreszenz). Zwischen Phthalid und Cumarin kann nicht unterschieden werden, da beide annähernd die gleichen R_f-Werte von 0,5 und 0,52 besitzen. Bei

R_f 0,54 ist beim Extrakt und bei der Vergleichsdroge eine Fluoreszenzlöschung zu erkennen.

Beim Extrakt sind wie bei der Vergleichsdroge dieselben Fluoreszenzlöschungen (R_f 0,08) und Fluoreszenzen (R_f 0,14, 0,29, 0,45) erkennbar. Ferner ist bei R_f 0,62 eine Fluoreszenz erkennbar. Eine Übereinstimmung mit Phthalsäurediethylester (R_f 0,62 aber Fluoreszenzlöschung) ist nicht anzunehmen. Bei der Detektion mit Antimon(III)-chlorid kann Umbelliferon im Extrakt (R_f 0,3 - blaue Fluoreszenz) und Cumarin (R_f 0,55 - graue Färbung) nachgewiesen werden. Phthalid und Phthalsäurediethylester lassen sich nicht detektieren.

Bei der Detektion mit ethanolischer Kalilauge kann nur Cumarin (R_f 0,48 - hellbraune Färbung) und Umbelliferon (R_f 0,32 - hellbraune Färbung) detektiert werden.

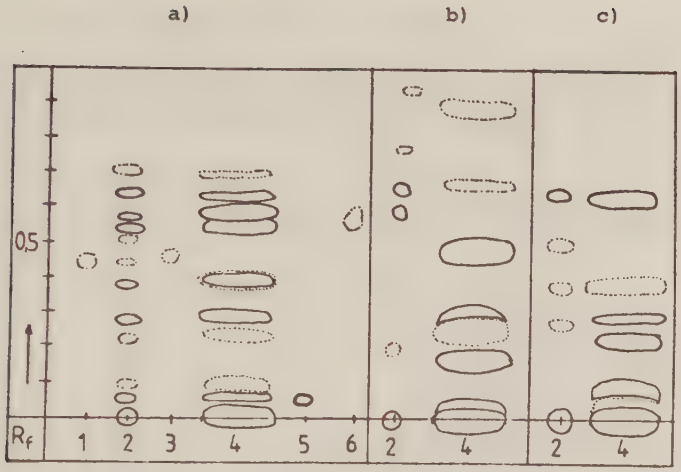


Abb. 7: DC Liebstöckel-Fluidextrakt (nach Stahl[13])
Fm: Benzol + Chloroform = 50 + 50, 2 x 10 cm,
Detektion: a) $UV_{254/365}$ (..../—),
b) Antimon(III)-chlorid und UV_{365}
und c) ethanol. KOH und UV_{365}

1 Cumarin
2 Vergleichsdroge
3 Phthalid
4 Extrakt
5 Umbelliferon
6 Phthalsäurediethylester

Auswertung:

Bei der Detektion im UV 254 nm kann nur Cumarin und/bzw. Phthalid in der Vergleichsdroge detektiert werden. Bei 365 nm kann Umbelliferon (R_f 0,04) detektiert werden. Nach 13 ist der R_f 0,62 dem Ligustilid (Fluoreszenz bei 365 nm) zuzuordnen. Bei der Detektion mit Antimon(III)-chlorid ist Cumarin (R_f 0,5 - graue Färbung) im Extrakt zu erkennen.

Umbelliferon ist bei R_f 0,03 noch mit hellbrauner Färbung zu detektieren.
Bei R_f 0,15, 0,65 und 0,87 sind noch gelbliche Fluoreszenzen zu erkennen, die auch bei der Vergleichsdroge auftreten.
Bei der Detektion mit ethanolischer Kalilauge und anschließender UV_{365}-Detektion läßt sich lediglich Umbelliferon detektieren.

(7) Wacholder-Fluidextrakt

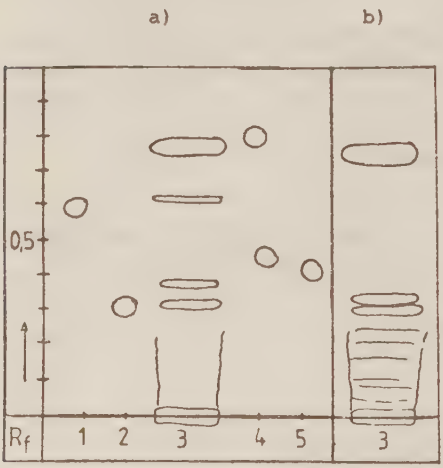


Abb. 8: DC Wacholder-Fluidextrakt
Fm: Dichlormethan,
Detektion: a) Anisaldehyd,
b) Molybdatophosphorsäure

1 α-Pinen
2 α-Terpineol
3 Extrakt
4 Caryophyllen
5 Cineol

Auswertung:

Mit Anisaldehyd nur schwach detektierbar sind α-Pinen, Caryophyllen und α-Terpineol. Mit Molybdatophosphorsäure gut zu detektieren ist Cineol.

(8) Melissen-Spissumextrakt

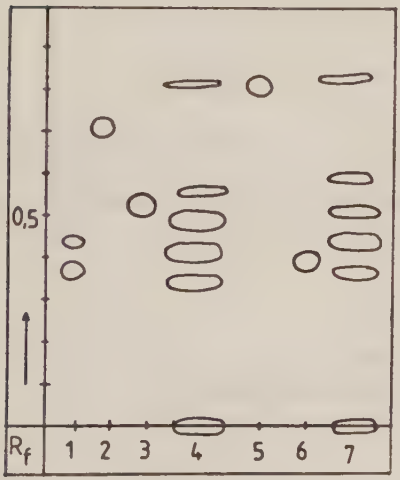


Abb. 9:
DC Melissen-Spissumextrakt
Fm: Dichlormethan,
Detektion: Anisaldehyd
1 Geraniol
2 Citral
3 Linalool
4 Extrakt 50 µl
5 Citronellal
6 Citronellol
7 Extrakt 30 µl

Auswertung:

Im Extrakt sind schwach Citronellol und Citronellal zu erkennen. Linalool kann nicht zugeordnet werden, da zwei Flekken bei R_f 0,51 und 0,58 auftreten. Geraniol kann bei R_f 0,41 nur noch angenommen werden. Citral kann nicht detektiert werden.

(9) Pfefferminz-Spissumextrakt

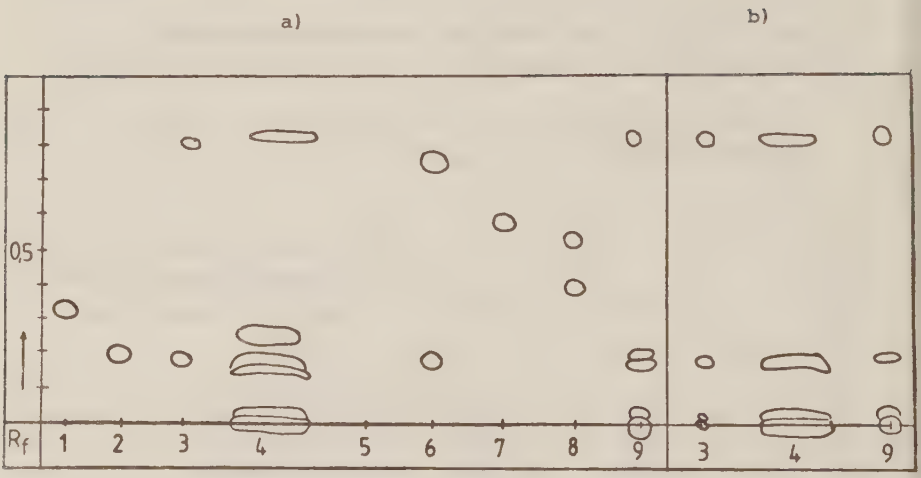


Abb. 10: DC Pfefferminz-Spissumextrakt
Fm: Chloroform + Benzol = 75 + 25,
Detektion: a) Anisaldehyd,
b) Molybdatophosphorsäure

1 Thymol
2 Menthol
3 Vergleichsdroge
4 Extrakt 50 µl
5 Cineol
6 Menthofuran
7 Menthylacetat
8 Menthon
9 Extrakt 30 µl

Auswertung:

Gut zu erkennen ist Menthol in der Vergleichsdroge, aber nur schwach im Extrakt. Thymol, Cineol, Menthylacetat und Menthon können nicht detektiert werden. Menthofuran kann gut nachgewiesen werden.

(10) Aromatische Tinktur (Tincutra aromatica DAB 6)

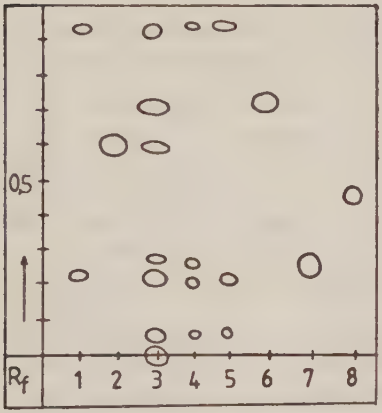


Abb. 11:
DC Aromatische Tinktur
Fm: Zweifachentwicklung
1. Dichlormethan,
2. Benzol
Detektion: Anisaldehyd

1 Kardamomen
2 Eugenol
3 Tinktur
4 Galgant
5 Ingwer
6 α-Pinen
7 α-Terpineol
8 Cineol

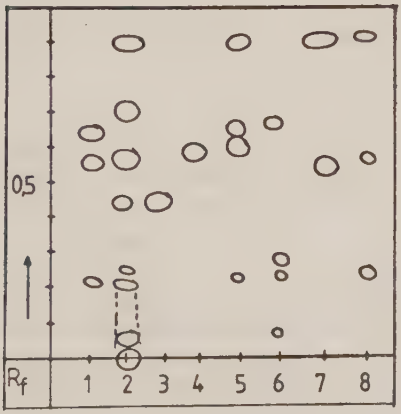


Abb. 12:
DC Aromatische Tinktur
Fm: Zweifachentwicklung:
1. Dichlormethan,
2. Benzol
Detektion: Molybdato-phosphorsäure

1 Ceylonzimt
2 Tinktur
3 Cineol
4 Eugenol
5 Gewürznelken
6 Galgant
7 Caryophyllen
8 Ingwer

Auswertung:

In der Tinktur sind mit Molybdatophosphorsäure gut Cineol, Eugenol und Caryophyllen nachzuweisen. Mit Anisaldehyd lassen sich Eugenol und α-Terpineol gut detektieren.

α-Pinen färbt sich als Vergleichssubstanz grün, in der Tinktur ist auf dieser Höhe des R_f-Wertes nur eine graue Färbung zu erkennen.

Bei R_f 0,05 kann Zingeron (vgl. 13) detektiert werden. Ferner lassen sich noch zahlreiche in den Vergleichsdrogen vorkommenden Substanzen auch in der Tinktur detektieren.

Wie schon bei Extractum Juniperi treten im DC bei Caryophyllen zwei Flecken auf. Dies rührt daher, daß α-Caryophyllen rein nicht zu isolieren ist. Daher ist als Beimengung immer auch noch β-Caryophyllen vorhanden.

2.2 Vereinheitlichung der DC-Systeme

Um die dc Arbeiten auf eine einheitliche Grundlage zu stellen, wurde versucht eine Einheitsentwicklung für alle Extrakte zu finden. Dabei wurden die Versuche in 2.1 als Grundlage verwendet (Tab. 1).

Tab. 1: Fließmittel, mit denen die einzelnen Extrakte entwickelt wurden in 2.1

Extrakt	Fm oder Fm-Gemisch
Anisextrakt	Benzol
Aromatische Tinktur	1. Dichlormethan 2. Benzol
Baldrianextrakt	Hexan/Ethylmethylketon
Fenchelextrakt	Dichlormethan
Kamillenextrakt	Chloroform/Benzol
Kümmelextrakt	Dichlormethan
Liebstöckelextrakt	Benzol/Diethylether/2N-Essigsäure Benzol/Chloroform
Melissenextrakt	Chloroform
Pfefferminzextrakt	Chloroform/Benzol
Wacholderextrakt	Dichlormethan

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, werden hauptsächlich Benzol und halogenierte Kohlenwasserstoffe niederen Molekulargewichts, vor allem Dichlormethan, zur Entwicklung von terpenhaltigen Extrakten verwendet.

Es ergab sich aus den verschiedensten Mischungen eine Zweifachentwicklung. Zunächst wird das jeweilige DC mit Dichlormethan über 10 cm entwickelt. Nach einer 10minütigen Trocknungszeit wird dasselbe DC in Toluol + Ethylacetat = 9 + 1 ein zweites Mal entwickelt. Wir konnten feststellen, daß diese Zwiefachentwicklung für eine halbquantitative Bestimmung von Inhaltsstoffen anhand der jeweiligen Vergleichs-

stoffe eine gute Aussage zuläßt. Dies ist vor allem dann von Vorteil, wenn man Extrakte in Mischung chromatographieren möchte. Bei einer so großen Fülle von Inhaltsstoffen, wie sie bei Extrakten angetroffen wird, ermöglicht die Zweifachentwicklung noch eine genügend gute Auftrennung zweier benachbarter Flecke, die bei einem anderen Entwicklungssystem aufeinander zu liegen kommen. So kann beim Vorhandensein geeigneter Vergleichssubstanzen der einzelne Extrakt gut charakterisiert werden. Darüber hinaus bieten verschiedene Sprühreagenzien eine weitere Aussage über den jeweils verwendeten Extrakt und dessen Inhaltsstoffe.

Am Beispiel des Anisextraktes wurde eine Zweifachentwicklung ausgearbeitet (Abb. 13).

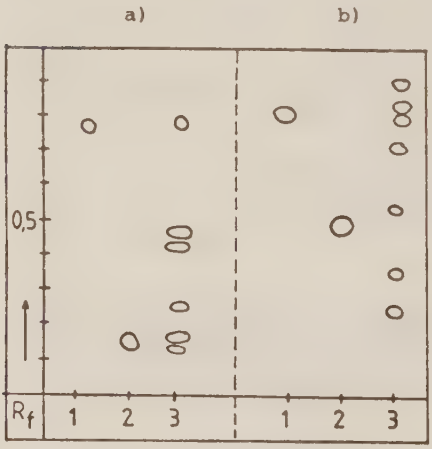


Abb. 13: DC Anis-Fluidextrakt

Fm: a) Benzol
b) Zweifachentwicklung:
1) Dichlormethan
2) Toluol + Ethylacetat = 9 + 1,

Detektion: Molybdatophosphorsäure

1 Anethol

2 Anisaldehyd

3 Anisfluidextrakt

Es wurde weiterhin der Versuch unternommen, die Extrakte anders aufzuarbeiten. Beim Ausschütteln mit Hexan/Ethylmethylketon werden außer den ätherischen Ölbestandteilen noch meist braune Farbstoffe aus den Extrakten mit ausgeschüttelt. Bei der Dünnschichtchromatographie und auch bei der späteren HPLC-Untersuchung stören diese Begleitstoffe erheblich. Bei den DCs treten Schwanzbildungen vom Start an bis zu einem R_f-Bereich von etwa 0,6 auf, die einen Nachweis mit den Sprühreagenzien sehr stören. Bei der HPLC würden diese braunen Stoffe die verwendete Säule binnen kurzer Zeit verschmutzen und dadurch für weitere Trennungen unbrauchbar machen.

In manchen Monographien von Drogen[5,6,8] wird zur weiteren Identifizierung der dort beschriebenen Drogen mittels Dünnschichtchromatographie das bei der ätherischen Ölgehaltsbestimmung erhaltene in Xylol aufgefangene Destillat herangezogen.

Das in der Vorschrift angegebene Xylol erwies sich aber im Laufe der vielen Destillationen von Extrakten nicht als optimal. Die vorgelegte organische Phase sank während der Destillationszeit (1,5 Stunden) im graduierten Meßrohr nach unten. Sehr stark trat diese Erscheinung bei Anisfluid-, Fenchelfluidextrakt und bei der Tinctura aromatica auf. Man kann sich das folgendermaßen erklären: Bei allen Fluidextrakten geht beim Destillieren Ethanol mit über. Alle Fluidextrakte enthalten Ethanol zwischen 30 % und 70 % (V/V). Dieses übergehende Gemisch aus ätherischem Öl und Ethanol gibt mit dem vorgelegten Xylol eine Mischung, die spezifisch schwerer ist als Wasser. Weiterhin wurde bei einigen Extrakten im Laufe der Destillation eine feine Tröpfchenbildung des Xylol/Destillat-Gemisches in Wasser beobachtet. Diese feinen Tröpfchen sanken ebenfalls langsam nach unten, ohne sich wieder zu vereinigen. Somit erwies sich die im Ph.Eur. vorgeschriebene Destillationsvorlage als ungeeignet.

Eine geeignetere organische Flüssigkeit müßte folgende Punkte erfüllen:

- sie darf mit Wasser nicht mischbar sein,
- sie muß spezifisch leichter als Wasser sein und höchstens die Dichte des Xylols besitzen (0,86),
- sie sollte ungefähr denselben Dampfdruck wie Xylol besitzen,
- sie darf bei den späteren HPLC-Untersuchungen die UV-Bestimmung nicht beeinträchtigen.

Einige organische Lösungsmittel, die diese Bedingungen erfüllen, sind (Tab. 2):

Tab. 2: Organische Lösungsmittel, die leichter als Wasser und nicht mit Wasser mischbar sind.

Flüssigkeit	Dichte	Kp [°C]
n-Heptan	0,684	97 - 99
iso-Octan	0,690	97 - 100
Dibutylether	0,764	141 - 142
Xylol	0,86	137 - 140

Die Versuche wurden mit Anisfluid- und Fenchelfluidextrakt durchgeführt, da diese die oben beschriebene Erscheinung am auffälligsten zeigten.
Das beste Ergebnis zeigte bei dieser Versuchsreihe n-Heptan. Bei den übrigen zwei Flüssigkeiten konnte man eine Abnahme der organischen Flüssigkeit beobachten (vor allem bei Dibutylether). In der Destillationsvorlage, die iso-Octan enthielt, waren überhaupt keine Terpene nachzuweisen.

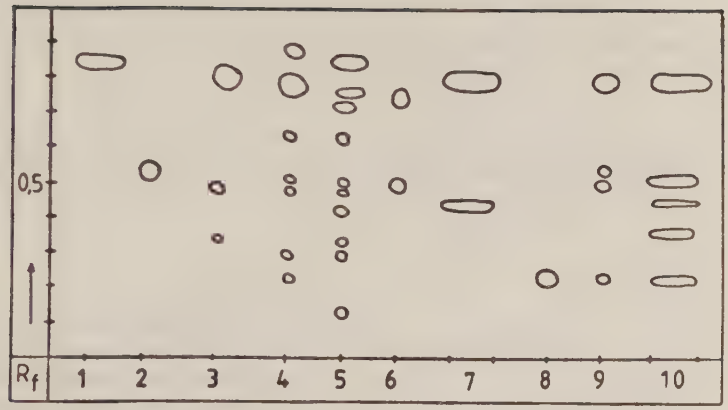


Abb. 14: DC Anis-Fluidextrakt und Fenchel-Fluidextrakt
Fm: Zweifachentwicklung in
1. Dichlormethan,
2. Toluol + Ethylacetat = 9 + 1
Detektion: Molybdatophosphorsäure

1 Anisextrakt in n-Heptan aufgefangen
2 Anisaldehyd
3 Anethol
4 Anis-Vergleichsdroge in Xylol aufgefangen
5 Anis-Vergleichsextrakt in Xylol aufgefangen
6 Ol. Olivarum
7 Fenchelextrakt in iso-Octan aufgefangen
8 Fenchon
9 Fenchelextrakt in Dibutylether aufgefangen
10 Fenchel-Vergleichsdroge in Xylol aufgefangen

Da diese Ergebnisse nicht sehr befriedigend waren, wurde nach weiteren Verbesserungen der Wasserdampfdestillation gesucht.
Ph.Eur.III schreibt bei der ätherischen Ölgehaltsbestimmung von Kamillenblüten als Destillierflüssigkeit eine 1proz. Natriumchloridlösung vor. Diese Vorschrift[5] und

nach Ausführungen von O. Moritz[14] wurde eine Vorschrift erarbeitet, die es gestattet, die Wasserdampfdestillation beizubehalten. So wurde eine 1proz. Natriumchloridlösung als Destillierflüssigkeit eingesetzt.

Am Beispiel von Kümmelfluidextrakt wird gezeigt, daß diese Konzentration ausreicht, die Destillationsvorlage mit dem Destillat am Absinken zu hindern.

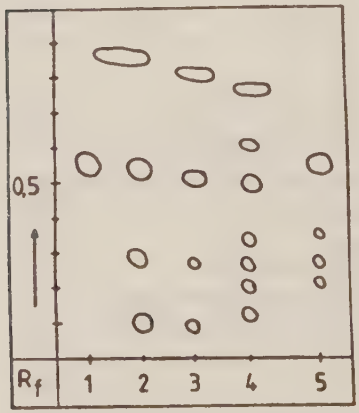


Abb. 15:
DC Kümmel-Fluidextrakt
Fm: Zweifachentwicklung
1. Dichlormethan
2. Toluol/Ethylacetat,
detektiert mit Molybdatophosphorsäure

1 Carvon
2 Extrakt aufgefangen in Dibutylether
3 Extrakt, dest. mit 1 % NaCl aufgefangen in Xylol
4 Extrakt, dest. mit gesätt. NaCl, aufgefangen in Xylol
5 Vergleichsdroge

Als Ergebnis der Versuche zur Optimierung der Wasserdampfdestillation von terpenhaltigen Pflanzenextrakten können wir festhalten:

- Verwendung einer wäßrigen 1proz. Natriumchloridlösung als Destillationsflüssigkeit. Dies ist sehr viel vorteilhafter, vor allem bei Apiaceendrogen-Zubereitungen. Man erreicht damit, daß ein Absinken der Destillationsvorlage mit dem überdestillierten Terpengemisch verhindert wird. Die Konzentration der Natriumchloridlösung spielt hierbei keine Rolle.

- Als Destillationsvorlage erwies sich Heptan als günstig, da es ähnlich wie Xylol, Terpene aufzunehmen vermag. Lediglich bedingt durch den Siedepunkt knapp unter 100° C, können im Laufe der Destillation geringfügige Verluste auftreten. Ein großer Vorteil gegenüber Xylol ist die sehr gute UV-Durchlässigkeit von Heptan. Bei 220 nm hat es eine Durchlässigkeit von 80 %, während Xylol bei dieser Wellenlänge keine Transmission besitzt. Dies ist besonders für eine UV-Detektion in der HPLC wichtig.

2.3 Dünnschichtchromatographische Charakterisierung nach Wasserdampfdestillation

(1) Anis-Fluidextrakt

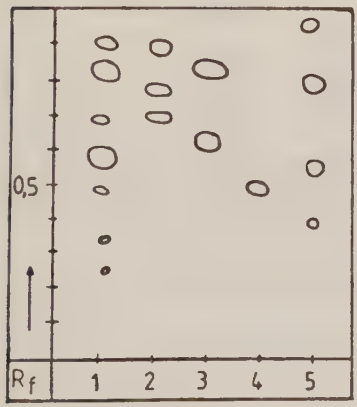


Abb. 16:
DC Anis-Fluidextrakt
Fm: Zweifachentwicklung, Detektion: Molybdatophosphorsäure
1 Vergleichsdroge
2 Extrakt
3 Anethol
4 Anisaldehyd
5 Ol. Olivarum

Auswertung:

Im Extrakt wird ein dem Anethol nicht identischer Fleck bei R_f 0,9 detektiert. Hier könnte es sich um Methylchavicol, dem Isomeren von Anethol, oder um Dianethol handeln. Auch eine Zuordnung zu einer Fraktion des fetten Öls wäre mög-

lich. Bei R_f 0,75 läßt sich ebenfalls ein nicht genau zu identifizierender Fleck erkennen. Bei R_f 0,68 und 0,58 sind zwei mit der Vergleichsdroge identische Flecke detektierbar.
Anethol selber läßt sich nur ganz schwach nachweisen. Anisaldehyd ist dagegen nicht detektierbar.

(2) Baldrian-Fluidextrakt

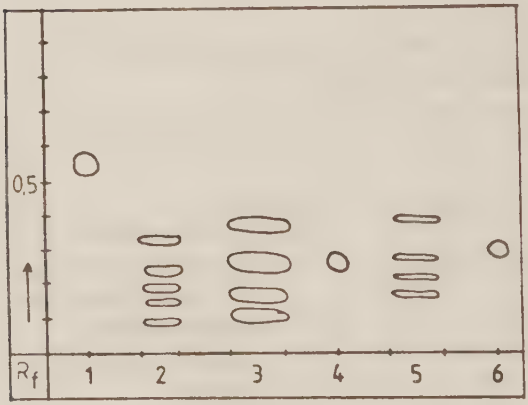


Abb. 17: DC Baldrian-Fluidextrakt
Fm: Zweifachentwicklung, Detektion: DNPH
1 Anisaldehyd
2 Extrakt
3 Valmane^R-Auszug
4 Didrovaltrat
5 Vergleichsdroge
6 Vanillin

Auswertung:

Im Chromatogramm des Heptanauszugs sind eine Reihe von gefärbten Zonen sichtbar.
Bei R_f 0,37 ist Valtrat mit schwach blauer Farbe detektierbar. Bei R_f 0,28, 0,21 und 0,16 sind drei gelb gefärbte Zonen zu erkennen. Bei R_f 0,1 ist noch mit schwach blauer Farbe Isovaleroxyhydroxydidrovaltrat (IVHD) zu erkennen.

(3) Fenchel-Fluidextrakt

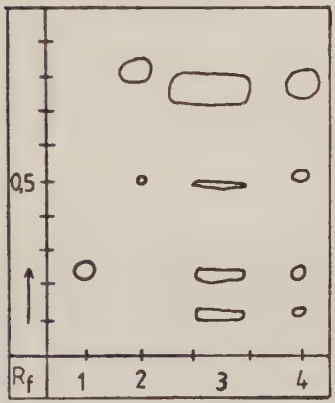


Abb. 18:
DC Fenchel-Fluidextrakt
Fm: Zweifachentwicklung,
Detektion: Molybdatophosphorsäure
1 Fenchon
2 Anethol
3 Extrakt
4 Vergleichsdroge

Auswertung:

Fenchon läßt sich ziemlich schwach detektieren. Dagegen sind Anethol und Anisaldehyd gut erkennbar.

(4) Kamillen-Fluidextrakt

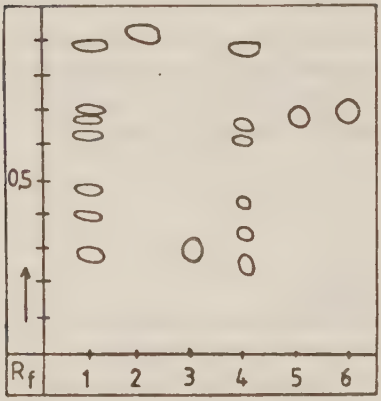


Abb. 19:
DC Kamillen-Fluidextrakt
Fm: Zweifachentwicklung,
Detektion: Anisaldehyd
1 Extrakt
2 Guajazulen
3 Borneol
4 Vergleichsdroge
5 Thujon
6 Bornylacetat

Auswertung:

Guajazulen erscheint im Extrakt und in der Vergleichsdroge nicht als roter, sondern als blauer Fleck (Chamazulen?). Weiterhin gut zu detektieren ist Borneol. Dagegen läßt sich Bornylacetat nur noch sehr schwach erkennen. Bei R_f 0,62 und 0,67 sind sowohl im Extrakt als auch in der Vergleichsdroge zwei deutlich braun gefärbte Flecken zu erkennen, die weder dem Bornylacetat noch dem Thujon zugeordnet werden können. Bei R_f 0,4 und 0,47 sind wiederum in Extrakt und Vergleichsdroge zwei deutlich blau gefärbte Flecken sichtbar. Diese können dem Bisabolol und/bzw. dem Pseudobisabolol zugeordnet werden[5].

(5) Kümmel-Fluidextrakt

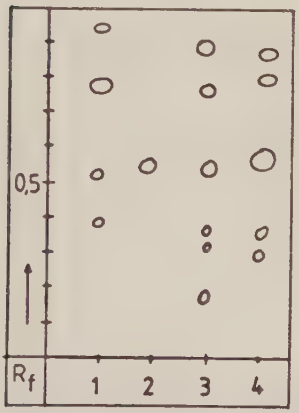


Abb. 20:
DC Kümmel-Fluidextrakt.
Fm: Zweifachentwicklung,
Detektion: Molybdatophosphorsäure
1 Ol. Olivarum
2 Carvon
3 Extrakt
4 Vergleichsdroge

Auswertung:

Gut zu erkennen ist Carvon (R_f 0,5). Bei R_f 0,75 ist ein Fleck zu erkennen, der dem fetten Öl zugeordnet werden kann. Eine Zuordnung zu Anethol ist unwahrscheinlich. Im Extrakt sind noch weitere Flecken erkennbar, die mit denen aus der Vergleichsdroge identisch sind (z.B. Limonen R_f 0,85).

(6) Liebstöckel-Fluidextrakt

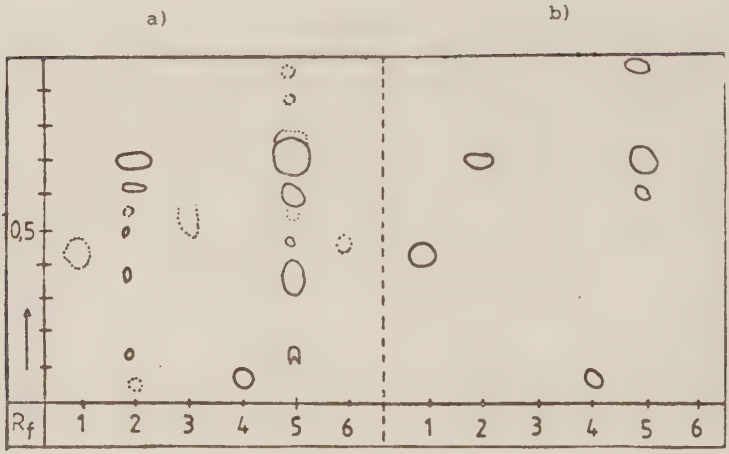


Abb. 21: DC Liebstöckel-Fluidextrakt
Fm: Zweifachentwicklung,
Detektion: a) $UV_{254/365}$ (--/—)
b) Antimon(III)-chlorid/UV_{365}

1 Cumarin
2 Extrakt
3 Phthalsäurediethylester
4 Umbelliferon
5 Vergleichsdroge
6 Phthalid

Auswertung:

Von den Vergleichssubstanzen kann im Extrakt und in der Vergleichsdroge keine nachgewiesen werden. Bei R_f 0,7 ist bei der Betrachtung im UV 365 nm eine starke hellblaue Fluoreszenz zu beobachten, die nach dem Besprühen gelb fluoresziert bei 365 nm. Hierbei handelt es sich um den Hauptinhaltsstoff Ligustilid[13].

(7) Wacholder-Fluidextrakt

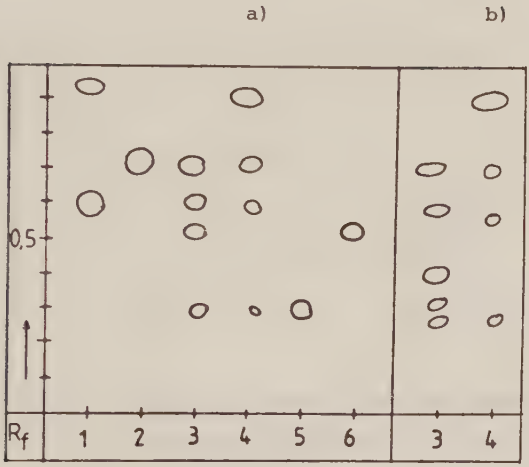


Abb. 22: DC Wacholder-Fluidextrakt
Fm: Zweifachentwicklung,
Detektion: a) Anisaldehyd,
b) Molybdatophosphorsäure

1 Caryophyllen
2 α-Pinen
3 Extrakt
4 Vergleichsdroge
5 α-Terpineol
6 Cineol

Auswertung:

Nach dem Besprühen mit Anisaldehyd und Molybdatophosphorsäure sind α-Pinen und Cineol schwach erkennbar. Caryophyllen und α-Terpineol lassen sich gut detektieren.

Daß bei Caryophyllen zwei R_f-Werte auftreten, liegt daran, daß α-Caryophyllen rein nicht zu isolieren ist. Daher ist als Beimengung immer auch noch β-Caryophyllen vorhanden.

(8) Melissen-Spissumextrakt

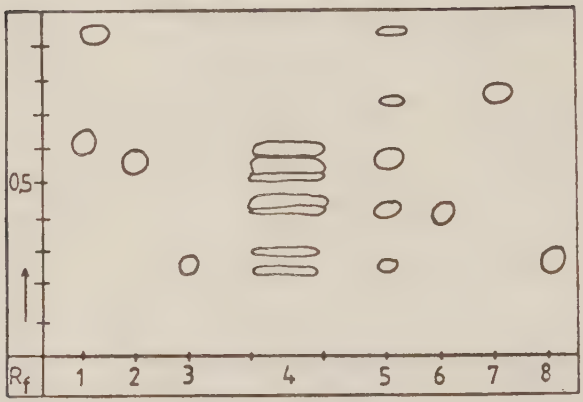


Abb. 23: DC Melissen-Spissumextrakt
Fm: Zweifachentwicklung,
Detektion: Anisaldehyd

1 Caryophyllen
2 Citral
3 Geraniol
4 Extrakt
5 Vergleichsdroge
6 Linalool
7 Citronellal
8 Citronellol

Auswertung:

Nach dem Besprühen ist Caryophyllen sehr gut nachzuweisen. Schwach detektierbar sind Citral und Linalool. Citronellal ist nicht zu erkennen. Eine Unterscheidung in Citronellol und Geraniol ist nicht zu treffen, da beiden denselben R_f-Wert besitzen.

(9) Pfefferminz-Spissumextrakt

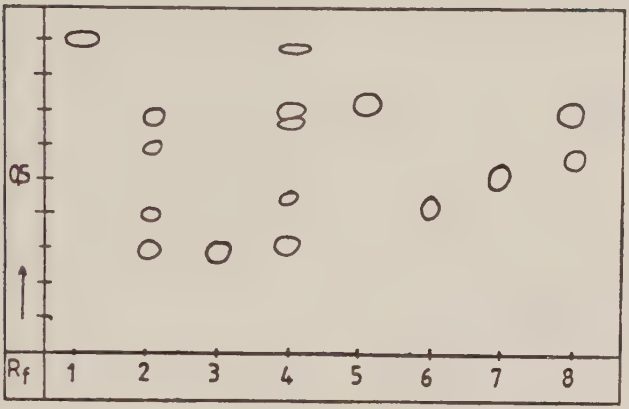


Abb. 24: DC Pfefferminz-Spissumextrakt
Fm: Zweifachentwicklung,
Detektion: Anisaldehyd
1 Menthofuran
2 Extrakt
3 Menthol
4 Vergleichsdroge
5 Menthylacetat
6 Cineol
7 Carvon
8 Menthon

Auswertung:

Das Menthon/Isomenthon-Gemisch kann im Extrakt nur schwach nachgewiesen werden. Fast gar nicht detektierbar ist Menthylacetat, wie auch Cineol. Nicht detektierbar ist Menthofuran. Menthol ist sehr gut nachzuweisen.

(10) Aromatische Tinktur

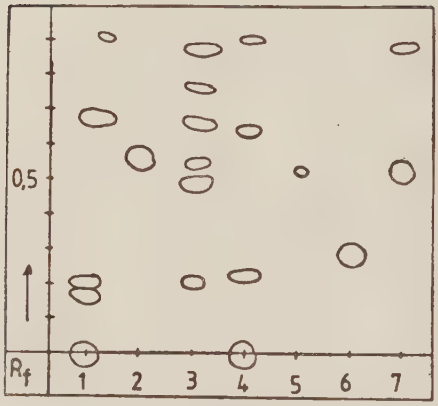


Abb. 25:
DC Aromatische Tinktur
Fm: Zweifachentwicklung,
Detektion: Anisaldehyd

1 Kardamomen
2 Eugenol
3 Tinktur
4 Galgant
5 α-Pinen
6 α-Terpineol
7 Caryophyllen

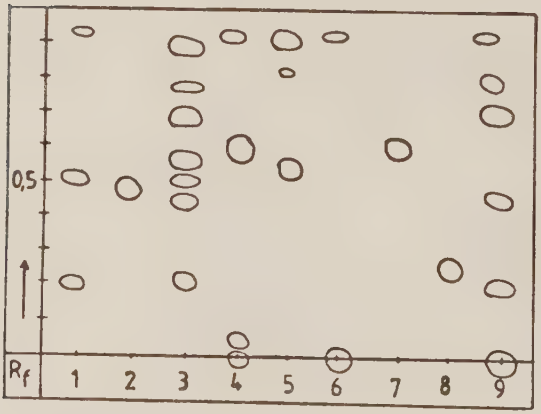


Abb. 26: DC Aromatische Tinktur
Fm: Zweifachentwicklung,
Detektion: Molybdatophsophorsäure

1 Zimt
2 Cineol
3 Tinktur
4 Nelken
5 Caryophyllen
6 Ingwer
7 Eugenol
8 α-Terpineol
9 Kardamomen

Auswertung:

Bei der Detektion mit a) ist Eugenol (R_f 0,54) und Caryophyllen (R_f 0,88) gut nachzuweisen. Bei R_f 0,48, das entspricht dem R_f von Cineol, tritt bei der Tinktur eine rote Färbung auf. Bei R_f 0,67 ist ein grauer Fleck detektierbar, der auch bei Fructus Cardamomi auftritt. Bei R_f 0,2 ist ein blauer Fleck zu erkennen, der auch in Rhizoma Galangae zu sehen ist.
Bei R_f 0,76 ist ein schwach roter Fleck erkennbar, der auch in Rhizoma Zingiberis auftritt.
Cineol und α-Pinen sind nicht eindeutig nachzuweisen.
Schwach zu erkennen ist α-Terpineol (R_f 0,28) mit grauer Farbe.
Bei der Detektion mit b) läßt sich auch keine bessere Detektion erreichen.

2.4 Übersichts-Dünnschichtchromatogramm eines Extraktgemisches

Das Extraktgemisch besteht aus folgender Zusammensetzung: Anis-, Fenchel-, Kamillen-, Kümmel-, Liebstöckel-, Wacholder-Fluidextrakt, Melissen- und Pfefferminz-Spissumextrakt.

a) Detektion: Anisaldehyd

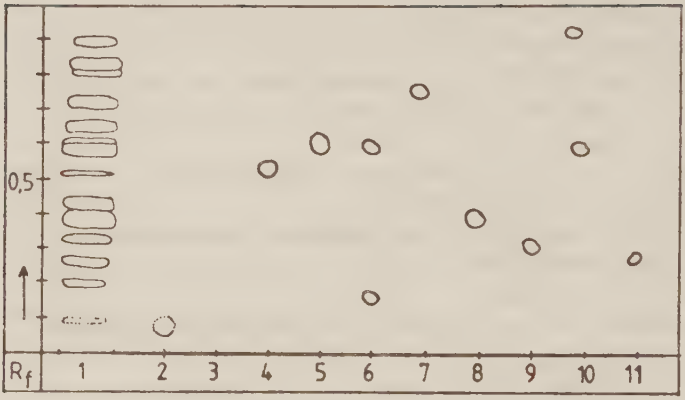


Abb. 27: DC eines Extraktgemisches aus Anis-, Fenchel-, Kamillen-, Kümmel-, Liebstöckel-, Wacholder-Fluidextrakt, Melissen- und Pfefferminz-Spissumextrakt

Fm: Zweifachentwicklung

1. Dichlormethan,
2. Toluol + Ethylacetat = 9 + 1

Detektion: Anisaldehyd

1	Extraktgemisch	7	α-Pinen
2	Umbelliferon	8	Menthol
3	Anisaldehyd/Anethol	9	α-Terpineol
4	Cineol	10	Caryophyllen
5	Carvon	11	Fenchon
6	Citral		

Auswertung:

Im Extraktgemisch kann man vor dem Besprühen bei R_f 0,08 Umbelliferon an seiner Fluoreszenz erkennen. Nach dem Besprühen lassen sich Anethol und Anisaldehyd mit dem Anisaldehyd-Sprühreagens nicht detektieren.
Alle anderen Vergleichsstoffe sind auch im Extraktgemisch gut zu erkennen.

b) Detektion: Molybdatophosphorsäure

Abb. 28: DC eines Extraktgemisches aus Anis-, Fenchel-, Kamillen-, Kümmel-, Liebstöckel-, Wacholder-Fluidextrakt, Melissen- und Pfefferminz-Spissumextrakt

Fm: Zweifachentwicklung

1. Dichlormethan,
2. Toluol + Ethylacetat = 9 + 1

Detektion: Molybdatophosphorsäure

1	Extraktgemisch	7	α-Pinen
2	Umbelliferon	8	Menthol
3	Anisaldehyd/Anethol	9	α-Terpineol
4	Cineol	10	Caryophyllen
5	Carvon	11	Fenchon
6	Citral		

Auswertung:

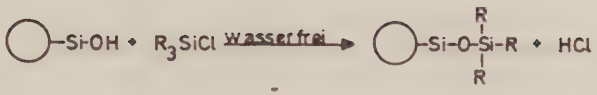
Mit Molybdatophosphorsäure lassen sich gut Anisaldehyd und Anethol nachweisen. Allerdings kann hier im Extraktgemisch keine eindeutige Charakterisierung des Anisaldehydfleckes getroffen werden, da der Carvonfleck zu dick erscheint.

3 HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN

Die Entwicklung der HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie = high pressure liquid chromatographie = high performance liquid chromatographie) wurde in den letzten Jahren zu einer nahezu universell anwendbaren Methode ausgebaut. Vor allem mit der Einführung von RP-Materialien (Reversed phase = umgekehrte Phase) als stationäre Phase können sowohl sehr polare wie auch sehr unpolare, folglich auch mittelpolare Komponenten sehr gut getrennt werden. Reversed-phase-Chromatographie ist eine echte Alternative zur Adsorptionschromatographie an Silicagel. Sie gewinnt immer mehr an Bedeutung. Es ist vorteilhaft, daß hier wie auch bei anderen gebundenen Phasen ein Desaktivator im Lösungsmittel entfällt. Auch auf die peinlich genaue Überwachung des Gehaltes an Wasser oder irgend eines anderen Spurenzusatzes in der mobilen Phase kann verzichtet werden. Weiterhin erfolgt eine rasche Gleichgewichtseinstellung zwischen mobiler und stationärer Phase. So genügt es bei einem Lösungsmittelwechsel, eine Menge entsprechend etwa 10 Säulenvolumina des neuen Eluenten durchzupumpen, um wieder reproduzierbar chromatographieren zu können. Diese einfachere Handhabung läßt ein schnelleres Auffinden eines geeigneten Fließmittelgemisches zu.

Bei den RP-Materialien handelt es sich um Kieselgel, das mit verschieden langen Kohlenwasserstoffketten verätherт ist. Diese stationäre Phase ist weniger polar als die mobile Phase.

Bei der Herstellung der Reversed-phase kann aus räumlichen Gründen nicht jede Silanolgruppe des Kieselgels reagieren und zu einer Si-O-Si-C-Bindung umgesetzt werden. Die Reaktion muß aber soweit gehen, daß die übriggebliebenen OH-Gruppen von den C_{18}- oder C_8-Schwänzen vollständig abgeschirmt werden.



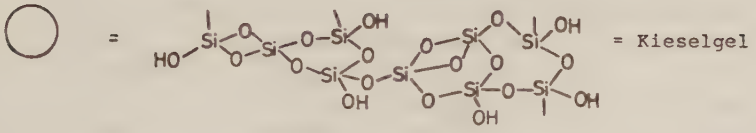


Abb. 29: Herstellung von Reversed-phase-Material
bei R = $-C_2H_5$ erhält man RP-2-,
R = $-C_8H_{17}$ erhält man RP-8-,
R = $-C_{18}H_{37}$ erhält man RP-18-Material

Die mobile Phase ist gewöhnlich eine Mischung aus Wasser und Methanol oder Wasser und Acetonitril. Gelegentlich wird noch eine Mischung aus Wasser und organischem Lösungsmittel mit einer Pufferlösung verwendet. Eine Mischung aus Wasser und Acetonitril hat eine Viskosität, die etwa um die Hälfte niedriger liegt als eine Mischung aus Wasser und Methanol bei gleichen Trenneigenschaften[15]. Der Nachteil dabei ist allerdings, daß Acetonitril wesentlich toxischer als Methanol ist.

3.1 Trennung mit Methanol-Wasser

3.1.1 Fluidextraktmischung auf RP 8

Für die Untersuchungen auf RP 8 mit Methanol-Wasser als Fließmittel wurden die folgenden, in Pharmazeutischen Präparaten häufig anzutreffenden Fluidextrakte ausgewählt: Anis-, Fenchel-, Kümmel-, Liebstöckel- und Wacholder-Fluidextrakt. Die Charakterisierung der Einzelextrakte in der Mischung sollte über die hauptsächlich vorkommenden Terpene

in den Drogen[16], die zur Herstellung der Einzelextrakte dienen, erfolgen. Da Anethol und Anisaldehyd in zwei der fünf Fluidextrakte in unterschiedlichen Konzentrationen vorkommen, wurde zunächst eine Mischung aus beiden mit dem Fließmittel Methanol + Wasser = 85 + 15 chromatographiert (Abb. 30).

Abb. 30:
HPLC von Anisaldehyd 0,2 % und Anethol 0,1 % in Methanol

Fm: Methanol + Wasser = 85 + 15,
Li-Chrosorb RP 8 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probemenge 10 µl,
Detektion: 220 nm
1 Anisaldehyd
2 Anethol

Dieses Trennsystem wurde auf ein Gemisch aus Anethol, Anisaldehyd (Anisextrakt), Carvon (Kümmelextrakt), Fenchon (Fenchelextrakt), α-Pinen (Wacholderextrakt) und Umbelliferon (Liebstöckelextrakt) übertragen (Tab. 3). Die Detektion erfolgte bei vier verschiedenen Wellenlängen (220 nm, 230 nm, 240 nm, 250 nm), weil die einzelnen Terpene in dem Bereich zwischen 220 und 250 nm ihre Absorptionsmaxima besitzen.

Tab. 3: Retentionszeiten der Einzelterpene bei Wellenlängen zwischen 220 und 250 nm (in min)

Terpen	enthalten in	Zeit
Anethol	Anis-, Fenchelextrakt	4,21
Anisaldehyd	Anis-, Fenchelextrakt	3,20
Carvon	Kümmelextrakt	3,56
Fenchon	Fenchelextrakt	2,94
α-Pinen	Wacholderextrakt	3,60
Umbelliferon	Liebstöckelextrakt	3,14

Da die Retentionszeiten der einzelnen Terpene zu nahe beieinander lagen, befriedigte dieses Trennsystem nicht. Dies wurde bei der Untersuchung von Mischungen der handelsüblichen und selbsthergestellten Fluidextrakte bestätigt, wobei die Probenvorbereitung wie in der DC über eine Wasserdampfdestillation erfolgte. In der Fluidextraktmischung aus handelsüblichen Extrakten war gut Anethol nachzuweisen. Bei 220 nm läßt sich auch noch Anisaldehyd erkennen. Ebenso kann Carvon detektiert werden. Dieser Peak ist jedoch bei zunehmender Wellenlänge nicht mehr eindeutig zu identifizieren.

Im Vergleich hierzu ist in der Fluidextraktmischung aus selbsthergestellten Extrakten sehr viel mehr Anisaldehyd und Anethol nachzuweisen.

3.1.2 Fluidextraktmischung auf RP 18

Eine Verbesserung der Trennung der Terpenmischung gelang auf RP 18 mit Methanol + Wasser = 85 + 15 (Tab. 4).

Tab. 4: Retentionszeiten der Einzelterpene bei Wellenlängen zwischen 220 und 250 nm (in min)

Terpen	enthalten in	Zeit
Anethol	Anis-, Fenchelextrakt	6,28
Anisaldehyd	Anis-, Fenchelextrakt	3,02
Carvon	Kümmelextrakt	3,82
Fenchon	Fenchelextrakt	2,58
α-Pinen	Wacholderextrakt	3,62
Umbelliferon	Liebstöckelextrakt	2,66

Diese Ergebnisse wurden im folgenden wiederum für je eine Mischung von handelsüblichen (Abb. 31) und selbsthergestellten (Abb. 32) Fluidextrakten verwendet.

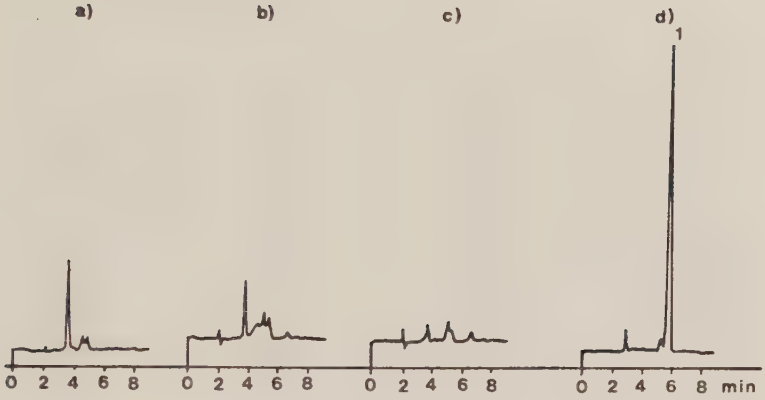


Abb. 31: HPLC einer Mischung von handelsüblichen Fluidextrakten aus Anis-, Fenchel-, Kümmel-, Liebstöckel- und Wacholder-Fluidextrakt

Fm: Methanol + Wasser = 85 + 15,
LiChrosorb RP 18 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probenmenge 20 µl
Detektion:

a) 220 nm
b) 230 nm
c) 240 nm
d) 250 nm

1 Anethol

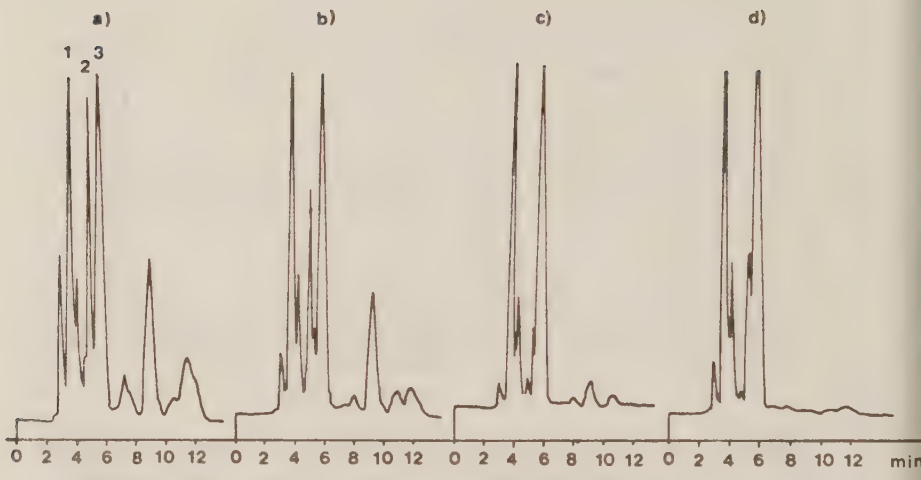


Abb. 32: HPLC einer Mischung von selbsthergestellten Fluidextrakten aus Anis-, Fenchel-, Kümmel-, Liebstöckel- und Wacholder-Fluidextrakt

Fm: Methahol + Wasser = 85 + 15,
LiChrosorb RP 18 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probenmenge 20 µl

Detektion:

a) 220 nm c) 240 nm
b) 230 nm d) 250 nm

1 Carvon
2 α-Pinen
3 Anethol

Aufgrund der verbesserten Trenneigenschaften des RP-18-Materials können bei 220, 230 und 240 nm Carvon, bei 250 nm Anethol und Anisaldehyd gut detektiert werden in der Mischung von handelsüblichen Fluidextrakten.

In der Mischung aus selbsthergestellten Fluidextrakten lassen sich gut Anethol, Anisaldehyd und Carvon nachweisen. Am geeignetsten erschien die Detektion bei 230 nm, da bei dieser Wellenlänge die oben angeführten Terpene am besten zu erkennen sind.

3.1.3 Spissumextraktmischung auf RP 8

Aus einer Vielzahl von in der Pharmazie verwendeten Spissumextrakten fiel die Wahl auf die beiden sehr häufig vorkommenden Melissen- und Pfefferminz-Spissumextrakt. Für die UV-Bestimmung konnten die in der jeweiligen Droge vorkommenden Hauptinhaltsstoffe Citronellal und Menthol nicht verwendet werden, da Menthol keine Chromophore besitzt, die eine UV-Bestimmung erlauben. Auch Citronellal ist nicht genügend UV-aktiv für eine HPLC-Bestimmung. So wurden Citral, das ein Isomerengemisch darstellt aus Geranial und Neral, und Piperiton als Vergleichssubstanzen verwendet.

Zunächst wurde eine Trennung dieser beiden Terpene mit dem Fließmittel versucht, wie es bei den Fluidextraktmischungen zur Anwendung kam (Abb. 33). Man kann sehr gut erkennen, daß die Elutionskraft des Gemisches aus Methanol + Wasser = 85 + 15 nicht ausreicht, um diese beiden Terpene zu trennen.

Abb. 33:
HPLC eines Gemisches aus Citral und Piperiton, je 0,1 % in Heptan
Fm: Methanol + Wasser = 85 + 15,
LiChrosorb RP 8 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Probenmenge 15 µl,
Detektion: UV 220 nm

Wegen der schlechten Trennung wurde der Gehalt an Wasser im Fließmittelgemisch heraufgesetzt. Bei einem Mischungsverhältnis Methanol + Wasser = 63 + 37 konnte Citral von Piperiton getrennt werden. Darüber hinaus erlaubt diese Mischung auch eine Auftrennung des Isomerengemisches Citral in seine beiden Isomeren Geranial und Neral (Abb. 34). Leider stieg der Säulenvordruck auf über das Doppelte an (ca. 250 bar). Bei längerem Arbeiten unter so hohen Drukken erwartet man ein Nachlassen der Trennleistung der Säule. Dies wirkt sich auf die Güte der Trennungen aus.

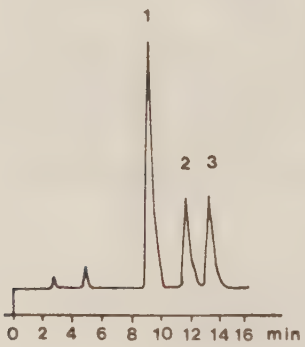


Abb. 34:
HPLC einer Mischung aus Citral und Piperiton, je 0,1 % in Heptan
Fm: Methanol + Wasser = 63 + 37
LiChrosorb RP 8 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Probenmenge 10 µl,
Detektion: UV 220 nm
1 Piperiton
2 Geranial
3 Neral
2+3 Citral

Diese Trennungsbedingungen wurden auf je eine Mischung aus handelsüblichen Melissen- und Pfefferminz-Spissumextrakten (Abb. 35) und selbsthergestellten Melissen- und Pfefferminz-Spissumextrakten (Abb. 36) angewendet.

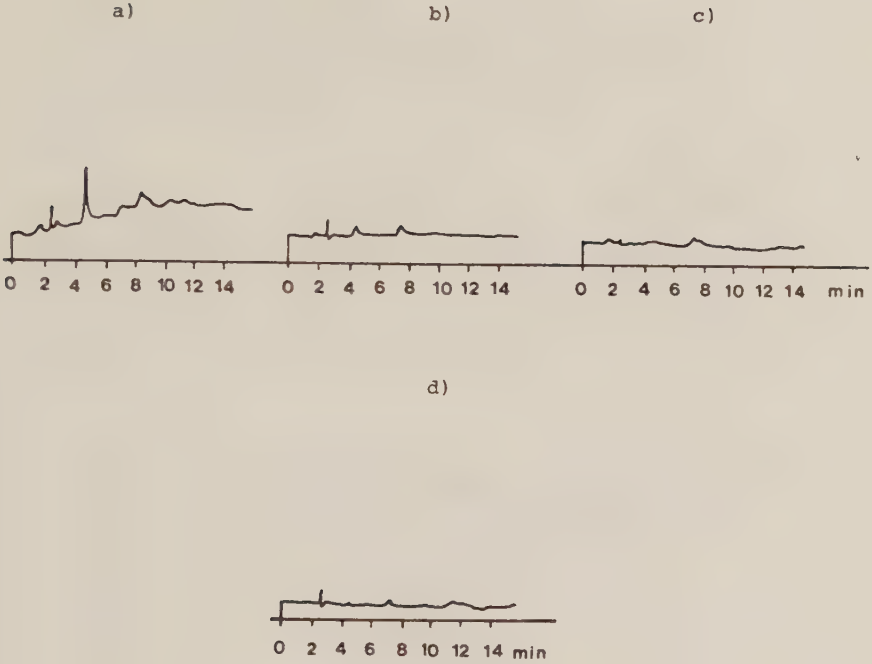


Abb. 35: HPLC einer Mischung von handelsüblichen Spissum-extrakten aus Melissen- und Pfefferminz-Spissum-extrakt

Fm: Methanol + Wasser = 63 + 37,
LiChrosorb RP 8 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probenmenge 20 µl,
Detektion:

a) 220 nm
b) 230 nm
c) 240 nm
d) 250 nm

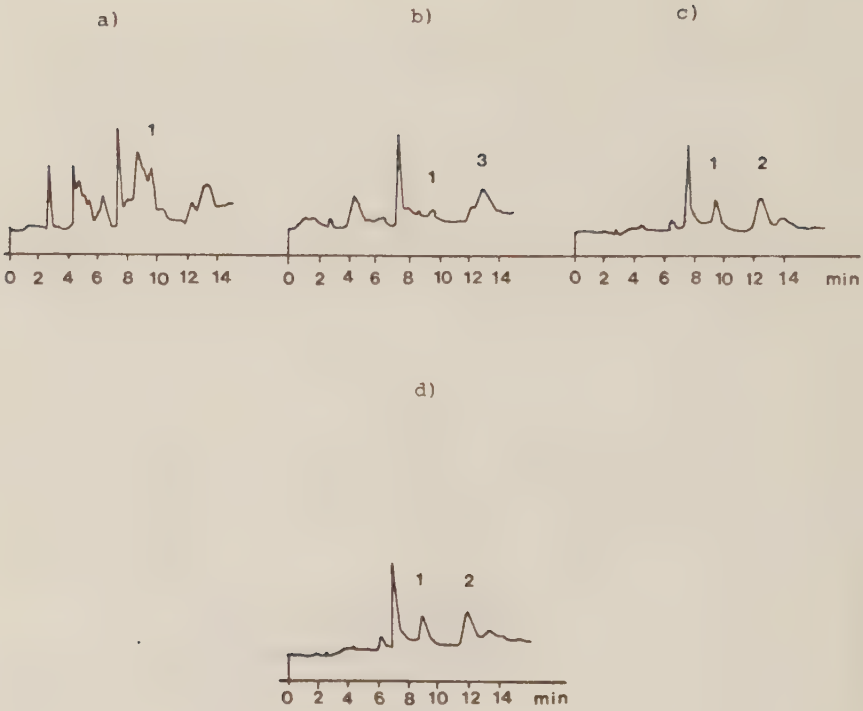


Abb. 36: HPLC einer Mischung von selbsthergestellten Spissumextrakten aus Melissen- und Pfefferminz-Spissumextrakt

Fm: Methanol + Wasser = 63 + 37,
LiChrosorb RP 8 7 µm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probenmenge 20 µl,
Detektion:

a) 220 nm c) 240 nm
b) 230 nm d) 250 nm

1 Piperiton
2 Geranial
3 Neral

Im Gegensatz zu der Mischung von handelsüblichen Spissumextrakten kann man in der Mischung von selbsthergestellten noch Piperiton (1) erkennen. Geranial und Neral lassen sich nur schwach erkennen (2) und (3).

3.1.4 Spissumextraktmischung auf RP 18

Mit dem lipophileren Material wurde zunächst der Versuch unternommen, die beiden Terpene Citral und Piperiton mit dem Fließmittelgemisch Methanol + Wasser = 85 + 15 zu trennen (Abb. 37).

Abb. 37:
HPLC eines Gemisches aus Citral und Piperiton, je 0,1 % in Heptan
Fm: Methanol + Wasser = 85 + 15,
LiChrosorb RP 18 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probemenge 15 µl,
Detektion: UV 220 nm

Auch auf RP-18-Material lassen sich Citral und Pipertion mit der mobilen Phase Methanol + Wasser = 85 + 15 nicht trennen. Eine Verbesserung wurde durch Senkung des Methanolanteils auf 63 % erreicht. Man erhält dann eine sehr gute Trennung der beiden Terpene in Geranial, Neral und Piperiton (Abb. 38).

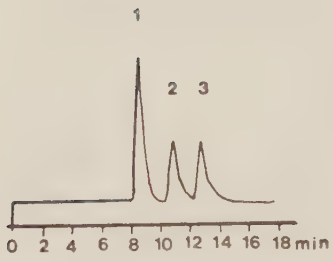


Abb. 38:

HPLC eines Gemisches aus Citral und Piperiton, je 0,1 % in Heptan

Fm: Methanol + Wasser = 63 + 37,
LiChrosorb RP 18 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probemenge 10 µl,
Detektion: UV 220 nm

1 Piperiton
2 Geranial
3 Neral

Je eine Mischung aus handelsüblichen und selbsthergestellten Melissen- und Pfefferminz-Spissumextrakt sollten unter diesen Bedingungen charakterisiert werden (Abb. 39 und 40).

Abb. 39: HPLC einer Mischung von handelsüblichen Melissen- und Pfefferminz-Spissumextrakt
Chromatographische Bedingungen s. Abb. 38,
Probemenge 20 µl,
Detektion: UV 230 nm

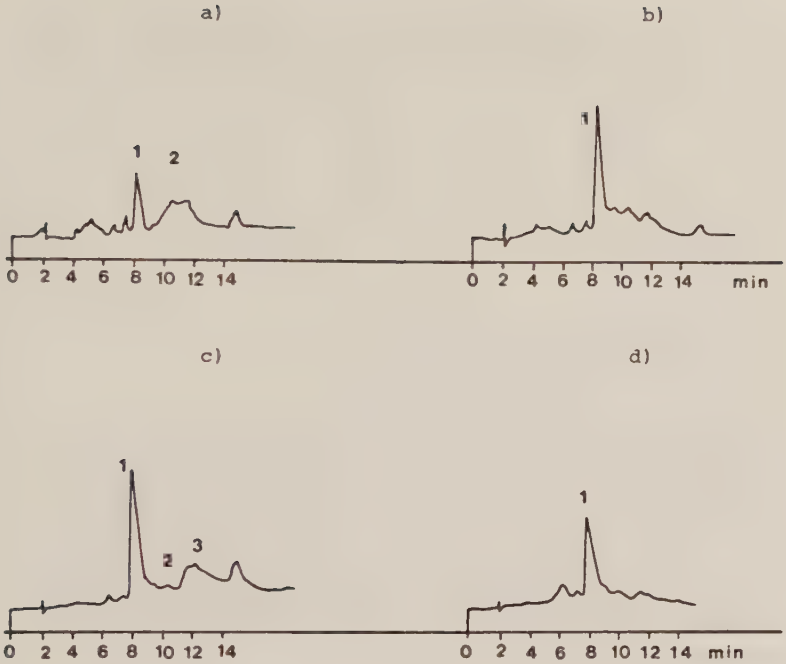


Abb. 40: HPLC einer Mischung von selbsthergestellten Melissen- und Pfefferminz-Spissumextrakt

Fm: Methanol + Wasser = 63 + 37,
LiChrosorb RP 18 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probenmenge 20 µl,
Detektion:

a) 220 nm c) 240 nm
b) 230 nm d) 250 nm

1 Piperiton
2 Geranial
3 Neral

Aufgrund der Ergebnisse der Trennung auf RP-8-Material konnten bei einer Trennung auf RP 18 keine Terpene in der Spissumextraktmischung von handelsüblichen Extrakten erwartet werden. Dagegen lassen sich in einer Mischung von selbstergestellten Spissumextrakten durchaus noch das Isomerengemisch Citral (2+3) und auch Piperiton (1) nachweisen. Auch hier wurde ein Ansteigen des Säulenvordrucks auf etwa 150 bar beobachtet.

3.2 Trennung mit Acetonitril-Wasser

Um für eine HPLC-Bestimmung ein Trennsystem zu erhalten, mit dem man sowohl Fluidextrakt- als auch Spissumextraktmischungen chromatographieren kann, wurde Acetonitril-Wasser als mobile Phase auf RP-Material ausgewählt. Dies hätte dann auch zur Folge, daß bei der Chromatographie von Spissumextraktmischungen der Säulenvordruck nicht solch hohe Werte erreicht, wie dies bei der Verwendung von Methanol-Wasser-Gemischen auftritt, besonders bei Erhöhung des Wasseranteils.

3.2.1 Fluidextraktmischung auf RP 8

Zur Beurteilung der Trenneigenschaft wurde eine Mischung aus Anethol, Anisaldehyd, Carvon, Fenchon, α-Pinen und Umbelliferon chromatographiert mit Acetonitril + Wasser = 6 + 4 (Tab. 5).

Tab. 5: Retentionszeiten der Einzelterpene bei Wellenlängen zwischen 220 und 250 nm (in min)

Terpen	enthalten in	Zeit
Anethol	Anis-, Fenchelextrakt	7,55
Anisaldehyd	Anis-, Fenchelextrakt	3,98
Carvon	Kümmelextrakt	5,35
Fenchon	Fenchelextrakt	2,89
α-Pinen	Wacholderextrakt	4,42
Umbelliferon	Liebstöckelextrakt	2,97

Wie man aus obenstehender Tabelle entnehmen kann, lassen sich diese sechs Terpene gut trennen zwischen 2,9 und 7,9 min. Wenn sich die Retentionszeiten der einzelnen Terpene so auseinanderziehen lassen, müßte diese chromatographische Trennung auch auf Fluidextraktmischungen anwendbar sein. Als Anwendungsbeispiel dienten Mischungen handelsüblicher und selbsthergestellter Fluidextrakte (Abb. 41 und 42).

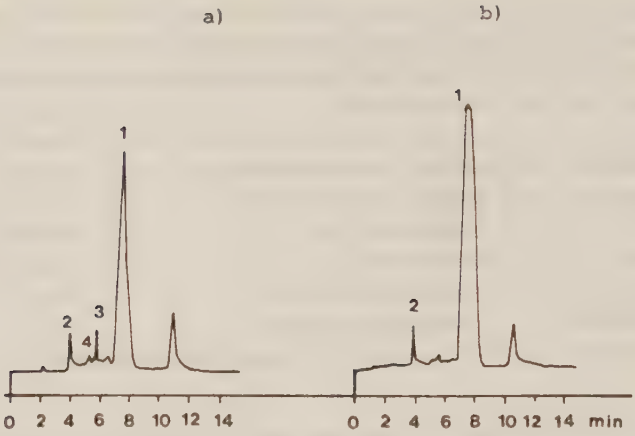


Abb. 41: HPLC einer Mischung aus handelsüblichen Fluidextrakten aus Anis-, Fenchel-, Kümmel-, Liebstöckel- und Wacholder-Fluidextrakt

Fm: Acetonitril + Wasser = 6 + 4,
LiChrosorb RP 8 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probenmenge 20 µl,
Detektion:
a) 230 nm
b) 250 nm

1 Anethol
2 Anisaldehyd
3 Carvon
4 α-Pinen

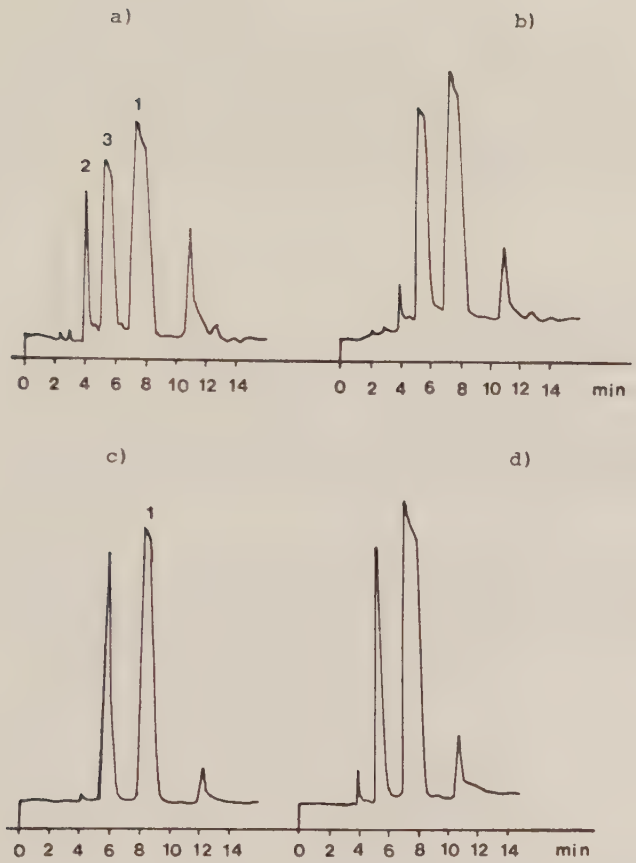


Abb. 42: HPLC einer Mischung von selbsthergestellten Fluidextrakten aus Anis-, Fenchel-, Kümmel-, Liebstöckel- und Wacholder-Fluidextrakt

Fm: Acetonitrol + Wasser = 6 + 4,
LiChrosorb RP 8 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probenmenge 20 µl,
Detektion:
a) 220 nm c) 240 nm
b) 230 nm d) 250 nm

1 Anethol
2 Anisaldehyd
3 Carvon

Mit der Änderung des Fließmittelgemisches von Methanol/Wasser zu Acetonitril/Wasser können bei einer Mischung handelsüblicher Fluidextrakte Anethol, Anisaldehyd und Carvon gut nachgewiesen werden. Bei der Mischung aus selbsthergestellten Fluidextrakten sind sehr gut Anethol, Anisaldehyd, Carvon und Fenchon, gerade noch α-Pinen nachzuweisen.

3.2.2 Fluidextraktmischung auf RP 18

Nachdem auf RP-8-Material mit Acetonitril/Wasser eine deutliche Verbesserung der Trennung erhalten worden ist, interessierte die Frage, ob dies auch auf RP-18-Material mit Acetonitril-Wasser-Gemisch zu erreichen ist. Das Terpengemisch wurde als Vergleich herangezogen (Tab. 6).

Tab. 6: Retentionszeiten der Einzelterpene bei Wellenlängen zwischen 220 und 250 nm (in min)

Terpen	enthalten in	Zeit
Anethol	Anis-, Fenchelextrakt	11,13
Anisaldehyd	Anis-, Fenchelextrakt	3,65
Carvon	Kümmelextrakt	5,98
Fenchon	Fenchelextrakt	7,47
α-Pinen	Wacholderextrakt	4,35
Umbelliferon	Liebstöckelextrakt	2,83

Alle sechs Terpene lassen sich sehr gut voneinander trennen (Tab. 6). Für diese chromatographischen Bedingungen wurden wieder je eine Mischung von handelsüblichen und selbsthergestellten Fluidextrakten herangezogen (Abb. 43 und Abb. 44).

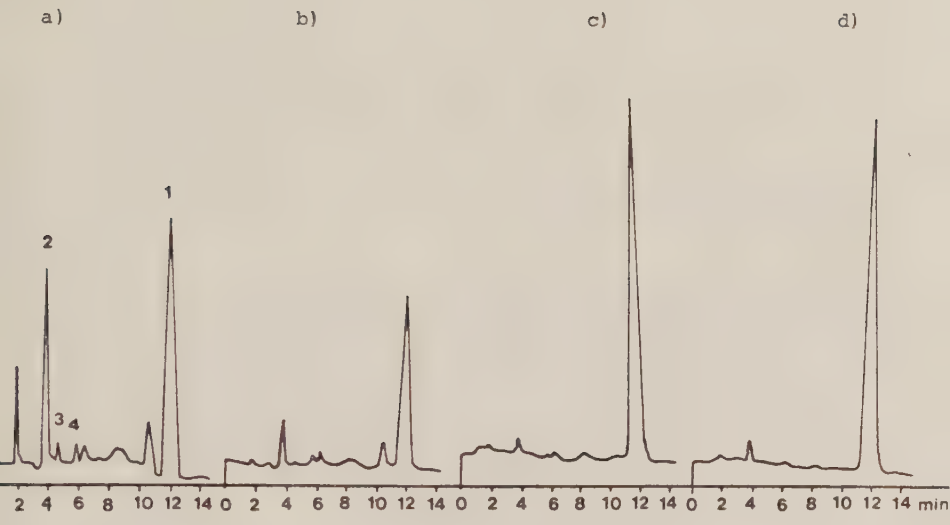


Abb. 43: HPLC einer Mischung von handelsüblichen Fluidextrakten aus Anis-, Fenchel-, Kümmel-, Liebstöckel- und Wacholder-Fluidextrakt

Fm: Acetonitril + Wasser = 6 + 4,
LiChrosorb RP 18 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probenmenge 20 µl,
Detektion:
a) 220 nm c) 240 nm
b) 230 nm d) 250 nm

1 Anethol
2 Anisaldehyd
3 α-Pinen
4 Carvon

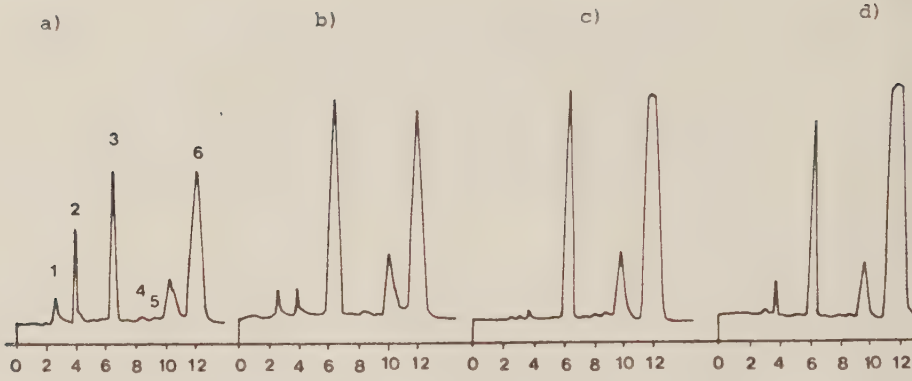


Abb. 44: HPLC einer Mischung von selbsthergestellten Fluidextrakten aus Anis-, Fenchel-, Kümmel-, Liebstökkel- und Wacholder-Fluidextrakt
Fm: Acetonitril + Wasser = 6 + 4,
LiChrosorb RP 18 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probenmenge 20 µl,
Detektion:
a) 220 nm c) 240 nm
b) 230 nm d) 250 nm

1	Umbelliferon	4	α-Pinen
2	Anisaldehyd	5	Fenchon
3	Carvon	6	Anethol

In der Mischung von handelsüblichen Fluidextrakten läßt sich sehr gut Anethol nachweisen. Wesentlich schwächer lassen sich Anisaldehyd und Carvon detektieren. Von den übrigen Terpenen kann keines mehr erkannt werden.

In der Mischung von selbsthergestellten Fluidextrakten können Anethol, Anisaldehyd, Carvon und Umbelliferon erkannt werden. Fenchon und α-Pinen lassen sich nicht detektieren.

3.2.3 Spissumextraktmischung auf RP 8

Mit dem für die HPLC günstigeren Fließmittelgemisch Acetonitril-Wasser sollten auch Gemische von Spissumextrakten chromatographiert werden.
Zur Beurteilung der Güte der Trennbedingungen wurde zuerst ein Gemisch aus Citral und Piperiton chromatographiert (Tab. 7).

Tab. 7: Retentionszeiten der Einzelterpene bei Wellenlängen zwischen 220 und 250 nm (in min)

Terpen	enthalten in	Zeit
Geranial	Melissenextrakt	7,25
Neral	Melissenextrakt	7,63
Piperiton	Pfefferminzextrakt	6,11
Geranial + Neral = Citral		

Unter den verwandten chromatographischen Bedingungen läßt sich gut Citral von Piperiton trennen. Man erreicht allerdings keine Grundlinientrennung der beiden Isomere Geranial und Neral.

Im folgenden wurden diese Bedingungen auf Mischungen von handelsüblichen und selbsthergestellten Spissumextrakten angewendet (Abb. 45 und Abb. 46).

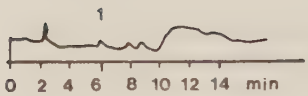


Abb. 45: HPLC einer Mischung von handelsüblichen Spissumextrakten aus Melissen- und Pfefferminz-Spissumextrakt
Fm: Acetonitril + Wasser = 6 + 4,
LiChrosorb RP 8 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probenmenge 20 µl,
Detektion: 230 nm
1 Piperiton

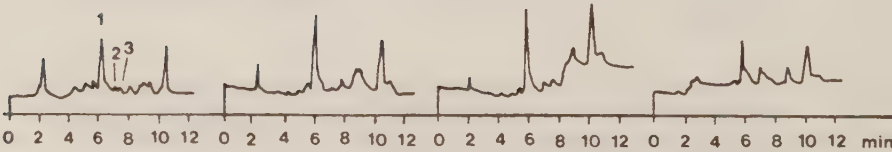


Abb. 46: HPLC einer Mischung von selbsthergestellten Spissumextrakten aus Melissen- und Pfefferminz-Spissumextrakt
Chromatographische Bedingungen s. Abb. 45,
Detektion:
a) 220 nm c) 240 nm
b) 230 nm d) 250 nm
1 Piperiton
2 Geranial
3 Neral

Nur ganz schwach läßt sich in der Mischung von handelsüblichen Spissumextrakten Piperiton (1) nachweisen.
Citral ist in vorliegender Mischung nicht mehr zu erkennen.

In der Mischung von selbsthergestellten Spissumextrakten kann man gut Piperiton erkennen. Citral läßt sich bei 250 nm gerade noch detektieren (Geranial).

3.2.4 Spissumextraktmischung auf RP 18

Eine noch bessere Auftrennung versprachen wir uns von einer Chromatographie auf RP-18-Material mit Acetonitril + Wasser = 6 + 4. Anhand der Terpenmischung von Citral und Piperiton soll dies zunächst gezeigt werden (Tab. 8).

Tab. 8: Retentionszeiten der Einzelterpene bei Wellenlängen zwischen 220 und 250 nm (in min)

Terpen	enthalten in	Zeit
Geranial	Melissenextrakt	7,42
Neral	Melissenextrakt	8,02
Piperiton	Pfefferminzextrakt	6,25
Geranial + Neral = Citral		

Wenn auch bei Citral unter den gewählten Bedingungen keine Grundlinientrennung in Geranial und Neral zu erreichen ist, so genügt das gewählte System aus, in Extrakten zwischen Citral und Piperiton unterscheiden zu können. Als Bestätigung dieser Aussage soll dies an Mischungen von handelsüblichen (Abb. 47) und selbsthergestellten Spissumextrakten (Abb. 48) gezeigt werden.

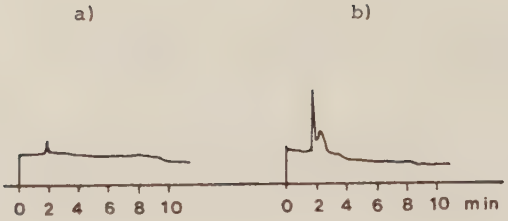


Abb. 47: HPLC einer Mischung von handelsüblichen Spissumextrakten aus Melissen- und Pfefferminz-Spissumextrakt

Fm: Acetonitril + Wasser = 6 + 4,
LiChrosorb RP 18 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probenmenge 20 µl,
Detektion:
a) 230 nm
b) 250 nm

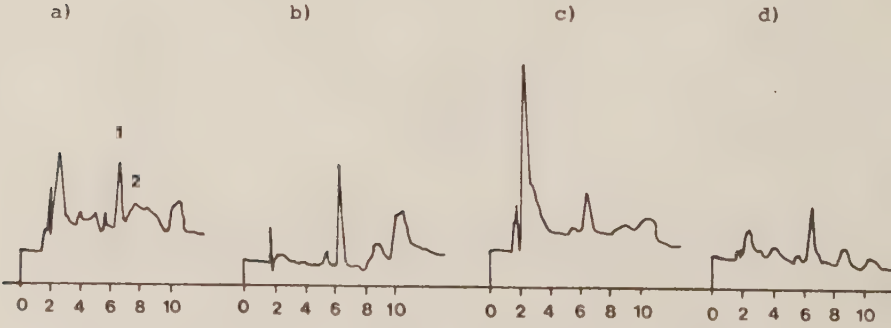


Abb. 48: HPLC einer Mischung von selbsthergestellten Spissumextrakten aus Melissen- und Pfefferminz-Spissumextrakt

Chromatographische Bedingungen s. Abb. 47,

Detektion:

a) 220 nm c) 240 nm
b) 230 nm d) 250 nm

1 Piperiton 2 Geranial

In der Mischung von selbsthergestellten Spissumextrakten läßt sich Piperiton (1) detektieren. Geranial (2) kann sicher bei einer Detektion von 220 und 230 nm noch erkannt werden. In der Mischung von handelsüblichen Spissumextrakten kann auch nach größtmöglicher Verstärkung am Detektor keines der zu erwartenden Terpene detektiert werden.

Die k'-Werte zu Tab. 6 und 8 errechnen sich zu:

$$k' = \frac{t_R - t_o}{t_o}$$

t_o = Totzeit
t_R = Bruttoretentionszeit

Tab. 9: k'-Werte der Terpene auf RP 18 mit Acetonitril + Wasser = 6 + 4 (t_o = 1,81 min)

Terpen	k'-Wert
Anethol	5,15
Anisaldehyd	1,02
Carvon	2,30
Fenchon	3,13
α-Pinen	1,41
Umbelliferon	0,56
Geranial	3,09
Neral	3,43
Piperiton	2,45

Die theoretische Bodenzahl läßt sich nach folgender Formel berechnen:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w}\right)^2$$

t_R = Retentionszeit
w = Peakbreite a.d. Basis

Für α-Pinen erhielt man 1211 theoretische Böden für eine 250-mm-Säule.

3.3 Quantitative Bestimmungen

Von den oben untersuchten Trennsystemen ist für eine quantitative Erfassung von Terpenen in Mischungen von Extrakten das System Acetonitril + Wasser = 6 + 4/RP 18 wegen seiner guten Selektivität am besten geeignet (Abb. 67, S. 101). Einen guten Überblick über in der HPLC verwendeten Auswertverfahren gibt Kaiser[17]. Zunächst wurde jeder Einzelextrakt anhand seines charakteristischen Terpens quantitativ bestimmt (Tab. 10). Es wurde Phthalsäuredibutylester als interner Standard verwendet, weil er an einer freien Stelle im Chromatogramm erscheint und bei der Wasserdampfdestillation quantitativ übergeht.

Tab. 10: Terpenbestimmung in Einzelextrakt (n = 5)

Fluidextrakte	Terpen	Gehalt [%]·10^{-4}	s_{rel} [%]
Anis-	Anethol	109 ± 1	0,9
	Anisaldehyd	3,1 ± 0,7	12,9
Fenchel-	Anethol	66 ± 0,2	0,3
	Anisaldehyd	0,3 ± 0,01	3,3
	Fenchon	67,9 ± 1	1,5
Kümmel-	Carvon	30,6 ± 0,1	0,3
Liebstöckel-	Umbelliferon	0,215 ± 0,02	9,1
Wacholder-	α-Pinen	132 ± 8	6,1
Spissumextrakte			
Melissen-	Citral	3,5 ± 0,09	2,6
Pfefferminz-	Piperiton	315,6 ± 3,7	1,2

Die Zuverlässigkeit der Methode ist durch die Linearität des UV-Detektors (s. Exp. Teil) und durch eine Wiederfindungsrate von 99,98 % für die Terpene (Zumischmethode) und von 99,99 % für den Standard gegeben.

Die Empfindlichkeit, definiert als reziproke Empfindlichkeit (1 % Absorption ≙ 0,0044 E) nach Welz[18], lag für die Terpene zwischen 0,45 µg/g und 2,4 µg/g.

Die Nachweisgrenze wurde nach Kaiser[19] ermittelt. Sie betrug zwischen 0,0027 µg/g und 8,228 µg/g (s. Exp. Teil).

Für die Probenvorbereitung wurde eine Wasserdampfdestillation in der Apparatur zur Bestimmung des ätherischen Ölgehalts in Drogen nach Ph.Eur. durchgeführt. Das übergehende Destillat wurde in n-Heptan aufgefangen. Die Destillationsflüssigkeit bestand aus einer 1proz. Natriumchloridlösung. Für die Bestimmung der Einzelextrakte (Anis-, Fenchel-, Kümmel-, Liebstöckel- und Wacholder-Fluidextrakt, Melissen- und Pfefferminz-Spissumextrakt) wurden 3 Teile Fluidextrakt bzw. 1,5 Teile Spissumextrakt eingesetzt.

Die Ergebnisse zeigen, daß das gewählte Verfahren recht gut zur Bestimmung der Leitterpene in den einzelnen Extrakten geeignet ist, obwohl relative Standardabweichungen bis zu 12 % (Anisaldehyd) zu verzeichnen sind. Auf Anisaldehyd als Leitsubstanz kann verzichtet werden, nicht jedoch auf Umbelliferon (s_{rel} = 9,1 %) und α-Pinen (s_{rel} = 6,1 %). Bei Umbelliferon handelt es sich um ein Cumarinderivat, das neben den Hauptinhaltsstoffen (Phthalide > 65 %) in Liebstöckelwurzel nur in sehr geringen Mengen vorkommt. Da der Pfefferminz-Spissumextrakt die Bestimmung von Umbelliferon, Fenchon, α-Pinen und Carvon stört, und sein Leitterpen Piperiton wegen ungenügender Trennung von Carvon nicht bestimmt wird, wurde er für die Extraktmischung nicht verwendet.

Die Extraktmischung (Abb. 49) bestand aus insgesamt 82,5 g (5 x 15,0 g Fluidextrakt und 7,5 g Spissumextrakt).

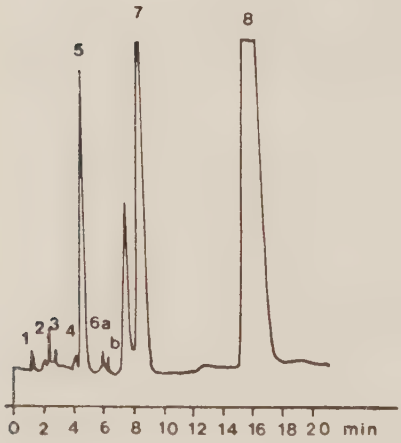


Abb. 49: HPLC einer Extraktmischung aus Anis-, Fenchel-, Kümmel-, Liebstöckel- und Wacholder-Fluidextrakt, je 3 Teile, und Melissen-Spissumextrakt, 1,5 Teile
Fm: Acetonitril + Wasser = 6 + 4,
LiChrosorb RP 18 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,4 ml/min,
Probenmenge 20 µl,
Detektion: 230 nm

1	Umbelliferon	6b	Neral
2	Fenchon	6a+6b	Citral
3	Anisaldehyd	7	Anethol
4	α-Pinen	8	Phthalsäure-dibutylester
5	Carvon		
6a	Geranial	(int. Standard)	

Neben der Bestimmung der Wiederfindungsrate der Terpene in der Mischung (Tab. 11) wurde auch der Gehalt der einzelnen Extrakte über die Leitterpene errechnet.

Die gewählten Bedingungen zur Bestimmung von Terpenen in einem Extraktgemisch können als zufriedenstellend bezeichnet werden. Man erhält Wiederfindungsraten zwischen 94 % (Melissen-Spissumextrakt) und 105 % (Wacholder-Fluidextrakt). Die rel. Standardabweichungen liegen zwischen 0,13 % (Kümmel-Fluidextrakt) und 2,81 % (Fenchel-Fluidextrakt). Nur beim Liebstöckel-Fluidextrakt tritt eine größere rel. Standardabweichung auf. Die Gründe für die etwas großen Abweichungen (sowohl bei den Wiederfindungsraten als auch bei den rel. Standardabweichungen) dürften bei der gewählten Detektorwellenlänge von 230 nm im ungünstigen Flächen-Konzentrations-Verhältnis (α-Pinen) und im zu geringen Mengenverhältnis Leitterpen : Extrakt (Umbelliferon, Citral) liegen. Bei der Bestimmung von Umbelliferon gelangt man zudem am Empfindlichkeitsbereich an.

Tab. 11: Bestimmung der Einzelextrakte im Gemisch (n = 5)

Extrakt	Einwaage im Gemisch [g/82,5 g]	gefunden (Mittelwert) [g]	s [g]	s_{rel} [%]	Wiederfindung [%]	bestimmt über	theore. Gehalt i. d. Mischg. [mg]	gefunden [mg]
Anis-Fluidextrakt	15,0	15,17	0,11	0,73	101,1	Anethol*	1,635	1,654 ± 0,012**
Fenchel-Fluidextrakt	15,0	15,32	0,43	2,81	102,1	Fenchon	1,0185	1,04 ± 0,03
Kümmel-Fluidextrakt	15,0	14,98	0,02	0,13	99,9	Carvon	0,459	0,458 ± 0,001
Liebstöckel-Fluidextr.	15,0	15,04	2,02	13,43	100,3	Umbelliferon	$3{,}225 \cdot 10^{-3}$	$3{,}233 \cdot 10^{-3} \pm 0{,}4 \cdot 10^{-3}$
Wacholder-Fluidextrakt	15,0	15,80	0,32	2,03	105,3	α-Pinen	1,980	2,085 ± 0,045
Melissen-Spissumextrakt	7,5	7,05	0,11	1,56	94,0	Citral	0,026	0,025 ± 0,001

* Der Anetholgehalt berechnet sich:

$$x = y \frac{a}{b}$$

a = theoretischer Gesamt-Anetholgehalt aus Anis- und Fenchel-Fluidextrakt

b = bestimmter Anetholgehalt des Anis-Fluidextraktes

y = gefundener Gesamt-Anetholgehalt in der Mischung

x = berechneter Anetholgehalt des Anis-Fluidextraktes in der Mischung

** Für die Abweichungen der Anetholgehalte gilt:

$$x' = x \frac{c}{y}$$

c = Standardabweichung des Gesamt-Anetholgehaltes

x' = Standardabweichung der Anis-Anetholbestimmung

4 ZUSAMMENFASSUNG

Zur Beurteilung von Gemischen aus Einzelextrakten (Fluid- und Spissumextrakte) ätherischer Öldrogen, die in der pharmazeutischen Praxis häufig anzutreffen sind, wurde eine einheitliche dünnschichtchromatographische Analytik erarbeitet. Zur Abtrennung unspezifischer und störender Begleitstoffe wurde die Probenvorbereitung über eine Wasserdampfdestillation durchgeführt. Nach der Methode der Zweifachentwicklung chromatographiert man auf Kieselgel zuerst mit Dichlormethan und nach einer Trocknungszeit mit Toluol + Ethylacetat = 9 + 1. Diese Fließmittel-Kombination wurde über eine vergleichende Zusammenstellung der Arzneibuchvorschriften der jeweiligen Drogen erarbeitet. Mit geeigneten Sprühreagenzien (Anisaldehyd, Antimon(III)-chlorid, Dinitrophenylhydrazin, ethanol. Kalilauge, Molybdatophosphorsäure) ließen sich die einzelnen Terpene der jeweiligen Extrakte relativ schnell und sicher identifizieren.

Zur Hochdruckflüssigkeitschromatographie von Fluid- und Spissumextrakten (Anis-, Fenchel-, Kümmel-, Liebstöckel- und Wacholder-Fluidextrakt, Melissen- und Pfefferminz-Spissumextrakt) wurden mehrere Verfahren auf "reversed-phase"-Materialien mit unterschiedlichen Fließmittelgemischen (Methanol-Wasser und Acetonitril-Wasser) erarbeitet. Eine gute Trennung und Identifizierung der eingesetzten Extrakte anhand charakteristischer Terpen-Inhaltsstoffe gelang auf RP 18 mit Acetonitril + Wasser = 6 + 4. Es wurde ausschließlich die UV-Detektion angewendet, auch wenn man damit manche Terpen-Inhaltsstoffe wegen deren Konstitution nicht erfassen konnte. Für jeden Extrakt ließ sich trotzdem ein entsprechendes "Fingerprint"-Chromatogramm erstellen. In handelsüblichen Extrakten konnten wesentlich weniger Terpene nachgewiesen werden als in vergleichbaren, selbstheregestellten.

Die quantitative Auswertung eines Gemisches aus Anis-, Fenchel-, Kümmel-, Liebstöckel- und Wacholder-Fluidextrakt sowie Melissen-Spissumextrakt erfolgte nach einer Wasserdampfdestillation anhand der charakteristischen Terpene mit Phthalsäuredibutylester als internem Standard. In dem gewählten Extraktgemisch werden einige Inhaltsstoffe (Anethol, Anisaldehyd) gemeinsam erfaßt, trotzdem ließ sich der Anis-Fluidextrakt ausgezeichnet über eine indirekte Methode bestimmen. Die Zuverlässigkeit der Bestimmungsmethode sowohl der Einzelextrakte als auch deren Mischung wurde überprüft. Die Empfindlichkeit (1 % Absorption ≙ 0,0044 E) lag zwischen 0,45 µg/g (Anethol) und 2,4 µg/g (α-Pinen), die Nachweisgrenze (n. H. Kaiser) betrug zwischen 0,0027 µg/g (Citral) und 8,228 µg/g (Fenchon). Im Arbeitsbereich zwischen 0 und 0,1 A herrschte Linearität.

Die Wiederfindungsraten im Extraktgemisch lagen zwischen 94 % (Melissen-Spissumextrakt) und 105 % (Wacholder-Fluidextrakt). Die Berechnung der rel. Standardabweichungen ergab Werte zwischen 0,13 % (Kümmel-Fluidextrakt) und 13,4 % (Liebstöckel-Fluidextrakt).

5 EXPERIMENTELLER TEIL

Herstellung der Extrakte nach DAB 8

Fluidextrakte

Die Fluidextrakte wurden durch Perkolation so hergestellt, daß aus 1 Teil Droge 2 Teile Fluidextrakt gewonnen wurden[6]. Als Extraktionsmittel wurde Ethanol (70 % (V/V) verwendet.

Für die Herstellung der Spissumextrakte wurde zunächst ein Fluidextrakt hergestellt (s.o.). Daraus wurde dann durch Einengen am Rotationsverdampfer der jeweilige Spissumextrakt gewonnen.

Der verwendete Perkolator bestand aus Glas mit einer Dochtlänge von 50 cm und einem mittlerem Durchmesser von 6 cm.

Probenvorbereitung, chromatographische Daten und Bedingungen zu 2.1

Probenvorbereitung

15 ml Fluidextrakt werden dreimal mit je 15 ml eines Gemisches aus Hexan-Ethylmethylketon = 1 + 1 ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden vorsichtig am Rotationsverdampfer auf ca. 5 ml eingeengt. Aus dieser Lösung wird aufgetragen.

10,0 g Spissumextrakt werden mit der doppelten Menge Ethanol 70 % (V/V) zu einem Fluidextrakt gelöst. Dieser Ansatz wird dreimal mit je 25 ml eines Gemisches aus Hexan-Ethylmethylketon = 1 + 1 ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden vorsichtig am Rotationsverdampfer auf ca. 5 ml eingeengt. Aus dieser Lösung wird aufgetragen.

Dünnschichtchromatographie

Zur Dünnschichtchromtographie wurden Kieselgel 60-F_{254}-Glasplatten der Firma Merck, Art.Nr. 5715, Darmstadt, mit einer Schichtdicke von 0,25 mm benutzt. Die Entwicklung der Platten erfolgte unter 20minütiger Kammersättigung (Auskleidung der Kammern mit Filtrierpapier) bei rel. Luftfeuchte 45 - 55 %.

Die Zusammensetzung der Fließmittel ist in Volumenteilen angegeben.

Aufgetragen wurden die Proben mit Hilfe von Einmal-Mikropipetten Blaubrand intramark^{R} der Größe 1 - 5 µl und 10 µl.

Chromatographische Daten und Bedingungen zu 2.1

(1) Anis-Fluidextrakt

Von der Untersuchungslösung werden 30 µl aufgetragen.
Als Vergleichslösungen werden verwendet:

Anethol	(3 µl/10 ml Toluol)	2 µl
Anisaldehyd	(100 mg/10 ml Toluol)	15 µl
Ol. Olivarum	(40 µl/ 1 ml Toluol)	10 µl
Drogenauszug nach Ph.Eur.III		20 µl

Fließmittel:
Benzol[5)]

Entwicklung:
Bei Kammersättigung über 10 cm

Detektion:
Molybdatophosphorsäure-Sprühreagens

	R_f-Werte	Farbe n.d. Besprühen
Anethol	0,61	blau
Anisaldehyd	0,15	orange
fettes Öl (Ol. Olivar.)	0,04 u. 0,25	blau

(2) Baldrian-Fluidextrakt

Von der Untersuchungslösung werden 50 µl bandförmig (16 x 5 mm) aufgetragen.

Als Untersuchungslösungen werden verwendet:

Vanillin	(28,5 mg/ 5 ml Methanol)	4 µl
Anisaldehyd	(100 mg/10 ml Methanol)	2 µl
Isovaleriansäure	(253 mg/ 5 ml Toluol)	10 µl
Vergleichsdroge (nach 5)		20 µl
Valmane^{R}-Auszug		20 µl

(Herstellung: 2 fein zerkleinerte Dragees werden in 5 ml Dichlormethan aufgeschlämmt. Nach fünfminütigem Schütteln wird abfiltriert. Das Filter wird zweimal mit je 2 ml Dichlormethan nachgewaschen. Das Filtrat wird schonend zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in 3 ml Methanol aufgenommen.)

Fließmittel
Hexan + Ethylmethylketon = 80 + 20[5)]

Entwicklung:
Bei Kammersättigung über 2 x 10 cm mit 10 Minuten Zwischentrocknung

Detektion:
Dinitrophenylhydrazin-Sprühreagens

	R_f-Werte	Farbe nach dem Besprühen
Anisaldehyd	0,47	orange
Vanillin	0,2	orange

(3) Fenchel-Fluidextrakt

Von der Untersuchungslösung werden 20 µl bandförmig (16 x 5 mm) aufgetragen.

Als Vergleichslösungen werden verwendet:

Anethol	(3 µl/10 ml Toluol)	2 µl
Anisaldehyd	(100 mg/10 ml Toluol)	10 µl
Fenchon	(1 g/ 1 ml Hexan)	1 µl
Oleum Olivarum	(40 µl/ 1 ml Toluol)	5 µl

Fließmittel:
Dichlormethan[6)]

Entwicklung:
Bei Kammersättigung über 10 cm

Detektion:
Molybdatophosphorsäure-Sprühreagens

	R_f-Werte	Farbe n.d. Besprühen
Anethol	0,76	blau
Anisaldehyd	0,41	orange
Fenchon	0,12	blau
fettes Öl (Ol. Olivar.)	0,04 u. 0,25	blau

(4) Kamillen-Fluidextrakt

Von der Untersuchungslösung werden 2 µl aufgetragen.

Als Vergleichslösungen werden verwendet:

Borneol	(100 mg/10 ml Toluol)	2 µl
Bornylacetat	(80 mg/10 ml Toluol)	2 µl
Guajazulen	(40 mg/10 ml Toluol)	2 µl
Drogenauszug nach Ph.Eur.III		4 µl

Fließmittel:
Chloroform + Benzol = 75 + 25[5)]

Entwicklung:
Bei Kammersättigung über 10 cm

Detektion:
a) UV 254 nm und 365 nm
b) Anisaldehyd-Sprühreagens

	R_f-Werte	Farbe nach dem Besprühen
Guajazulen	0,8	rot
Borneol	0,26	blau
Bornylacetat	0,57	blau

(5) Kümmel-Fluidextrakt

Von der Untersuchungslösung werden 30 µl aufgetragen.

Als Vergleichslösungen werden verwendet:

Carvon	(10 µl/ 1 ml Toluol)	5 µl
Ol. Olivarum	(100 mg/10 ml Toluol)	10 µl
Drogenauszug nach DAB 8		2 µl

Fließmittel:
Dichlormethan[6)]

Entwicklung:
Bei Kammersättigung über 10 cm

Detektion:
Molybdatophosphorsäure-Sprühreagens

	R_f-Werte	Farbe n.d. Besprühen
Carvon	0,35	blau
fettes Öl (Ol. Olivar.)	0,15 u. 0,56	blau

(6) Liebstöckel-Fluidextrakt

Von der Untersuchungslösung werden 50 µl bandförmig (18 x 6 mm) aufgetragen.

Als Vergleichslösungen werden verwendet:

Cumarin	(30 mg/10 ml Toluol)	2 µl
Phthalid	(200 mg/ 5 ml Toluol)	2 µl
Phthalsäurediethylester	(240 mg/ 2 ml Toluol)	2 µl
Umbelliferon	(50 mg/ 8 ml Methanol)	2 µl
Drogenauszug nach DAB 7/DDR		30 µl

Zum Vergleich seien hier zweierlei Vorschriften angeführt. Einmal nach DAB 7/DDR (I)[7] und zum anderen nach E. Stahl (II)[13].

I nach DAB 7/DDR

Fließmittel:
Oberphase aus Benzol + Diethylether + 2N Essigsäure
= 50 + 50 + 20

Entwicklung:
Bei Kammersättigung über 10 cm

Detektion:
a) UV 254 nm und 365 nm
b) Antimon(III)-chlorid-Sprühreagens
c) Ethanolische Kalilauge

	R_f-Werte
Cumarin	0,52
Phthalid	0,5
Phthalsäurediethylester	0,62
Umbelliferon	0,32

II nach E. Stahl

Fließmittel:
Benzol + Chloroform = 50 + 50

Entwicklung:
Bei Kammersättigung über 2 x 10 cm mit 10 Minuten Zwischentrocknung

Detektion:
a) UV 254 nm und 365 nm
b) Antimon(III)-chlorid-Sprühreagens
c) Ethanolische Kalilauge (nach DAB 7/DDR)

	R_f-Werte
Cumarin	0,45
Phthalid	0,45
Umbelliferon	0,04
Phthalsäurediethylester	0,53

(7) Wacholder-Fluidextrakt

Von der Untersuchungslösung werden 50 µl bandförmig (18 x 5 mm) aufgetragen.

Als Vergleichslösungen werden verwendet:

α-Pinen	(30 mg/2,5 ml Chloroform)	25 µl
α-Terpineol	(100 mg/2 ml Toluol)	4 µl
Caryophyllen	(40 mg/2,5 ml Chloroform)	5 µl
Cineol	(10 mg/10 ml Toluol)	15 µl

Fließmittel:
Dichlormethan[6)]

Entwicklung:
Bei Kammersättigung über 10 cm

Detektion:
a) Anisaldehyd-Sprühreagens
b) Molybdatophosphorsäure-Sprühreagens

	R_f-Werte
α-Pinen	0,59
α-Terpineol	0,32
Caryophyllen	0,46 u. 0,8
Cineol	0,44

(8) Melissen-Spissumextrakt

Von der Untersuchungslösung werden 30 µl und 50 µl bandförmig (13 x 4 mm) aufgetragen.

Als Vergleichslösungen werden verwendet:

Geraniol	(60 mg/2,5 ml Toluol)	4 µl
Citral	(30 mg/5 ml Toluol)	4 µl
Linalool	(65 mg/2,5 ml Toluol)	2 µl
Citronellal	(110 mg/2,5 ml Toluol)	2 µl
Citronellol	(140 mg/2,5 ml Toluol)	2 µl

Fließmittel:
Chloroform[6)]

Entwicklung:
Bei Kammersättigung über 2 x 12 cm mit 10 Minuten Zwischentrocknung

Detektion:
Anisaldehyd-Sprühreagens

	R_f-Werte
Geraniol	0,37 u. 0,44
Citral	0,74
Linalool	0,56
Citronellal	0,84
Citronellol	0,4

(9) Pfefferminz-Spissumextrakt

Von der Untersuchungslösung werden 30 µl punktförmig und 50 µl bandförmig (20 x 5 mm) aufgetragen.

Als Vergleichslösungen werden verwendet:

Thymol	(10 mg/10 ml Toluol)	5 µl
Menthol	(10 mg/10 ml Toluol)	5 µl
Cineol	(10 mg/10 ml Toluol)	4 µl
Menthofuran	(30 mg/2,5 ml Toluol)	5 µl
Menthylacetat	(30 mg/2,5 ml Toluol)	5 µl
Menthon	(40 mg/2,5 ml Toluol)	5 µl
Drogenvergleich nach Ph.Eur.III		20 µl

Fließmittel:
Chloroform + Benzol = 75 + 25[5)]

Entwicklung:
Bei Kammersättigung über 10 cm

Detektion:
a) Anisaldehyd-Sprühreagens
b) Molybdatophosphorsäure-Sprühreagens

	R_f-Werte
Thymol	0,34
Menthol	0,2
Menthofuran	0,75
Cineol	0,33
Menthylacetat	0,6
Menthon	0,4

(10) Aromatische Tinktur (Tincutra aromatica DAB 6)

Vorliegende Tinktur wird folgendermaßen zubereitet[20]:

Grob gepulverter Ceylonzimt	5 Teile
Grob gepulverter Ingwer	2 Teile
Grob gepulverter Galgant	1 Teil
Grob gepulverte Gewürznelken	1 Teil
Zerquetschte Malabar-Kardamomen	1 Teil
Verdünnter Weingeist	50 Teile

Als Untersuchungslösung werden vom Extrakt direkt 15 µl aufgetragen.

Als Vergleichslösungen werden verwendet:

Eugenol	(80 mg/10 ml Toluol)	5 µl
Cineol	(10 mg/10 ml Toluol)	10 µl
Caryophyllen	(130 mg/ 3 ml Toluol)	5 µl
α-Terpineol	(100 mg/ 3 ml Toluol)	5 µl
α-Pinen	(40 mg/10 ml Toluol)	10 µl

Als Vergleichsdrogen werden Auszüge hergestellt aus:

Zimt	50 µl
Gewürznelken	5 µl
Malabar-Kardamomen	30 µl
Galgant	15 µl
Ingwer	15 µl

0,5 Droge werden pulverisiert und mit 10 ml Dichlormethan unter Schütteln extrahiert. Nach dem Filtrieren wird das Filter zweimal mit je 3 ml Dichlormethan nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate werden schonend zur Trockene eingedampft und in 3 ml Toluol aufgenommen.

Fließmittel nach 13:
Zweifachentwicklung in
1. Dichlormethan und
2. Benzol

Entwicklung:
Bei Kammersättigung über 10 cm mit 10 Minuten Zwischentrocknung

Detektion:
Aufgrund der sehr verschiedenen Inhaltsstoffe und damit verbundenen Detektionsmöglichkeiten wurde in mit Anisaldehyd detektierbare Inhaltsstoffe (a) und mit Molybdatophosphorsäure detektierbare Inhaltsstoffe (b) eine willkürliche Einteilung getroffen.

	R_f-Werte
Cineol	0,45
Eugenol	0,6
Caryophyllen	0,54 u. 0,88
α-Terpineol	0,25
α-Pinen	0,71

Destillationsapparatur

Zur Destillation der Einzelextrakte wie der Extraktmischungen wurde die "Apparatur zur Gehaltsbestimmung von ätherischen Ölen in Drogen" des Europäischen Arzneibuchs verwendet.

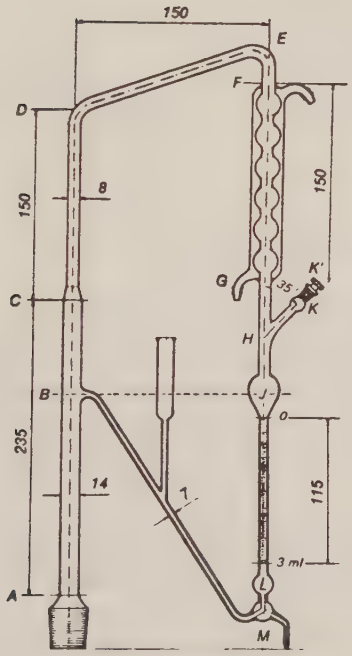


Abb. 50: Apparatur zur Gehaltsbestimmung von ätherischen Ölen in Drogen, Längenangaben in mm (Abb. nach Ph.Eur.)

Die Apparatur besteht aus einem Kurzhals-Rundkolben mit Glasschliff, einem Destillationsaufsatz (Abb. 50), einer Heizquelle und einem Stativ.

Der Destillationsaufsatz besteht aus:
- einem langen, aufsteigenden Glasrohr (AC),
- einem gewinkelten Glasrohr (CDE),
- einem Kugelkühler (FG),
- einem Glasstopfen mit Öffnung (Belüftungsstopfen K') sowie einem durchbohrten Ansatzstutzen (K),
- einem Glasrohr (GH),
- einer olivenartigen Erweiterung (J),
- einem Meßrohr (JL), unterteilt in 0,05 ml,
- einer kugelförmigen Erweiterung (L),
- einem Dreiwegehahn (M),
- einem Verbindungsrohr (BM).

Probenvorbereitung zu 2.2.2 und 3

In einen 500-ml-Rundkolben wurden 80,0 g Fluidextrakt oder 50,0 g Spissumextrakt (für dc Untersuchungen), 1,0 g Extrakt (für HPLC-Untersuchungen in 3.1 und 3.2) und 200 ml 1proz. Natriumchloridlösung eingebracht. Für die quantitativen HPLC-Untersuchungen wurde eine Mischung aus je 15,0 g Anis-, Fenchel-, Kümmel-, Liebstöckel- und Wacholder-Fluidextrakt und je 7,5 g Melissen- und Pfefferminz-Spissumextrakt mit 200 ml 1proz. Natriumchloridlösung eingewogen. Nach Zugabe einiger Siedesteinchen wird der Destillationsaufsatz aufgesetzt. Nach Abnehmen des Stopfens K' wird durch den Ansatzstutzen K soviel Wasser gegeben, bis es über das Verbindungsrohr bei B in den Destillationskolben fließt. Durch den Ansatzstutzen K wird mit Hilfe einer Pipette 1,00 ml n-Heptan eingefüllt. Der Stopfen K' wird wieder aufgesetzt und der Kolbeninhalt zum Sieden erhitzt. Nach 1,5 Stunden Destillationszeit wird die Heizquelle abgestellt und zehn Minuten später das "Destillat" abgelassen und aufgefangen. Das "Destillat" wird dann unverdünnt als Probe eingesetzt.

Probenvorbereitung zu 2.2.2

Baldrian-Fluidextrakt

50,0 g Fluidextrakt werden mit 20 ml n-Heptan in einem 100-ml-Rundkolben 1 Stunde am Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die n-Heptan-Phase abgetrennt und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in 2,0 ml n-Heptan aufgenommen. Aus dieser Untersuchungslösung wird aufgetragen.

Chromatographische Daten und Bedingungen zu 2.2

Vergleichslösungen und Detektionsmöglichkeiten sind von S. 68 ff. übernommen.

(1) Anis-Fluidextrakt

Von der Untersuchungslösung werden 20 µl aufgetragen.

	R_f-Werte
Anisaldehyd	0,53
Anethol	0,85
Fettel öl (Ol. Olivarum)	0,77

(2) Baldrian-Fluidextrakt

Von der Untersuchungslösung werden 50 µl bandförmig (10 x 2 mm) aufgetragen.

	R_f-Werte
Anisaldehyd	0,55
Vanillin	0,3
Didrovaltrat	0,3

(3) Fenchel-Fluidextrakt

Von der Untersuchungslösung werden 30 µl bandförmig (16 x 4 mm) aufgetragen.

	R_f-Werte
Fenchon	0,24
Anethol	0,8
Anisaldehyd	0,5

(4) Kamillen-Fluidextrakt

Von der Untersuchungslösung werden 15 µl aufgetragen.

	R_f-Werte	Farbe n.d. Besprühen
Guajazulen	0,9	rot
Bornylacetat	0,67	grün
Thujon	0,65	blau-violett
Borneol	0,29	grün

(5) Kümmel-Fluidextrakt

Von der Untersuchungslösung werden 20 µl aufgetragen.

	R_f-Werte
Carvon	0,5
Fettes Öl (Ol. Olivarum)	0,75

(6) Liebstöckel-Fluidextrakt

Von der Untersuchungslösung werden 20 µl aufgetragen.

	R_f-Werte
Cumarin	0,44
Phthalsäurediethylester	0,55
Umbelliferon	0,08
Phthalid	0,46

(7) Wacholder-Fluidextrakt

Von der Untersuchungslösung werden 60 µl aufgetragen.

	R_f-Werte	Farbe n.d. Besprühen mit a)
Caryophyllen	0,6 u. 0,94	dunkelviolett
α-Pinen	0,73	grau
α-Terpineol	0,28	schwach braun
Cineol	0,5	grau-braun

(8) Melissen-Spissumextrakt

Von der Untersuchungslösung werden 100 µl bandförmig (20 x 5 mm) aufgetragen.

	R_f-Werte	Farbe n.d. Besprühen
Caryophyllen	0,6 u. 0,94	dunkelviolett
Geraniol	0,25	grün
Citral	0,55	bräunlich-grau
Linalool	0,4	grün
Citronellal	0,77	blau
Citronellol	0,25	blau

(9) Pfefferminz-Spissumextrakt

Von der Untersuchungslösung werden 25 µl aufgetragen.

	R_f-Werte	Farbe n.d. Besprühen
Menthol	0,3	blau
Menthon	0,58 u. 0,71	hellgrün, geht über in hellbraun
Menthylacetat	0,74	blau
Menthofuran	0,9	orangegelblich
Cineol	0,43	blauviolett
Carvon	0,52	orange

(10) Aromatische Tinktur

Von der Untersuchungslösung werden 20 µl aufgetragen.

	R_f-Werte	Farbe n.d. Besprühen mit a)	b)
Eugenol	0,56	grün	blau
α-Pinen	0,52	hellgrün	blau
α-Terpineol	0,28	blau	blau
Cineol	0,46	graublau	blau
Caryophyllen	0,53 u. 0,88	rotviolett	blau

Chromatographische Daten und Bedingungen zu 2.4

Von der Untersuchungslösung werden 50 µl bandförmig (15 x 6 mm) aufgetragen.

Als Vergleichslösungen werden verwendet:

Umbelliferon	(10 mg/10 ml Methanol)	5 µl
Anisaldehyd/Anethol	(20 mg/10 mg/10 ml Heptan)	5 µl
Cineol	(10 mg/10 ml Heptan)	20 µl
Carvon	(30 mg/10 ml Heptan)	2 µl
Citral	(20 mg/10 ml Heptan)	10 µl
α-Pinen	(80 mg/10 ml Heptan)	10 µl
Menthol	(160 mg/10 ml Toluol)	10 µl
α-Terpineol	(50 mg/10 ml Heptan)	5 µl
Caryophyllen	(10 mg/10 ml Heptan)	10 µl
Fenchon	(100 mg/10 ml Heptan)	20 µl

	R_f-Werte	Farbe n.d. Besprühen mit a)	b)
Anisaldehyd	0,59	---	orange
Anethol	0,88	---	blau
Cineol	0,56	schwach braun	blau
Carvon	0,62	hellrot	grauviolett
Citral	0,16 u. 0,59	braungrau rötlich	blau
α-Pinen	0,75	braungrau	blau
Menthol	0,38	hellblau	blau
α-Terpineol	0,3	schwach braun	blau
Caryophyllen	0,59 u. 0,91	rotviolett	blau
Fenchon	0,28	blau	blau
		Detektion mit UV_{365}	
Umbelliferon	0,08	hellblaue Fluoreszenz	

Die Vorschriften der
Sprühreagenzien für die Dünnschichtchromatographie:

1) Anisaldehyd-Schwefelsäure auf Terpene

0,5 ml Anisaldehyd werden mit 10 ml Eisessig, 85 ml Methanol und 5 ml Schwefelsäure konz. in der angegebenen Reihenfolge gemischt.

2) Antimon(III)-chlorid auf Terpene bei Liebstöckel

25,0 g Antimon(III)-chlorid werden in 100 ml Chloroform gelöst.

3) Dinitrophenylhydrazin auf Valepotriate (DNPH)

In einem Gemisch aus 40 ml Eisessig, 40 ml 25 %ige Salzsäure und 20 ml Methanol werden 0,2 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin gelöst.

4) Ethanolische 2N Kalilauge

13,0 g Kaliumhydroxid werden mit 13,0 ml Wasser versetzt. Die erkaltete Mischung wird mit aldehydfreiem Äthanol zu 100,0 ml aufgefüllt. Nach 24 h wird die überstehende, klare Lösung abgegossen.

5) Molybdatophosphorsäure auf Mono-und Polyterpene

10,0 g Molybdatophosphorsäure werden in 100 ml Ethanol 96 % (V/V) gelöst.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Für die HPLC-Arbeiten stand ein Flüssigkeitschromatograph 9208 der Firma Kipp + Zonen zur Verfügung. Daran angeschlossen war ein Rheodyne Schleusenventil 7125 mit einer 20-µl-Injektionsschleife.
Die Proben wurden mit einer Hamilton-Spritze auf die Säule gebracht.

Zur Detektion wurde ein Schoeffel Zweistrahl-UV-Detektor mit variabler Wellenlänge, Spektroflow SF 770, ausgerüstet mit einer D_2-Lampe und einer Durchlfußzelle mit 8 µl Zellvolumen, verwendet.

Zur Aufzeichnung der Chromatogramme und zur Integration der Peakflächen diente der Integrator hp 3390 A, der direkt mit dem Detektor verbunden war.

Als stationäre Phase wurden Merck Stahlsäule Hibar^R, 250 x 4 mm, gefüllt mit LiChrosorb RP 8, Korngröße 7 µm, Art.Nr. 50341, und Merck Stahlsäule Hibar^R, 250 x 4 mm, gefüllt mit LiChrosorb RP 18, Korngröße 7 µm, Art.Nr. 50394, verwendet.

Zur Entgasung der Fließmittel (bis 1 l) wurde eine Ultraschallwanne Bandelin Sonorex TK 52 verwendet.

HPLC zu 3.1.1

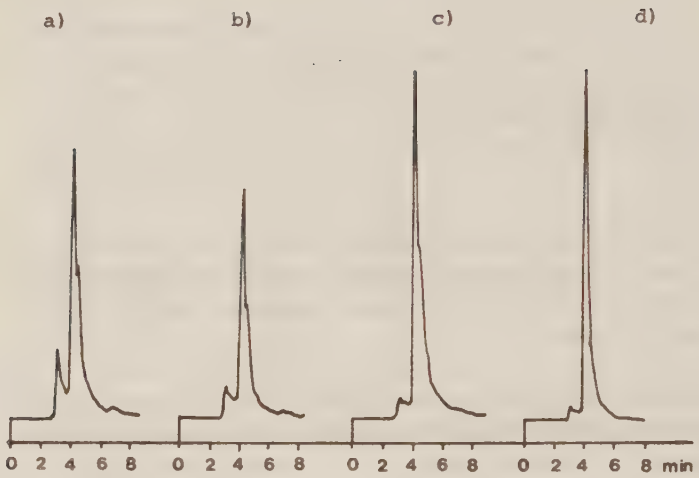


Abb. 51: HPLC einer Mischung von handelsüblichen Fluidextrakten aus Anis-, Fenchel-, Kümmel-, Liebstöckel- und Wacholder-Fluidextrakt
Fm: Methanol + Wasser = 85 + 15,
LiChrosorb RP 8 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probenmenge 20 µl,
Detektion:
a) 220 nm
b) 230 nm
c) 240 nm
d) 250 nm

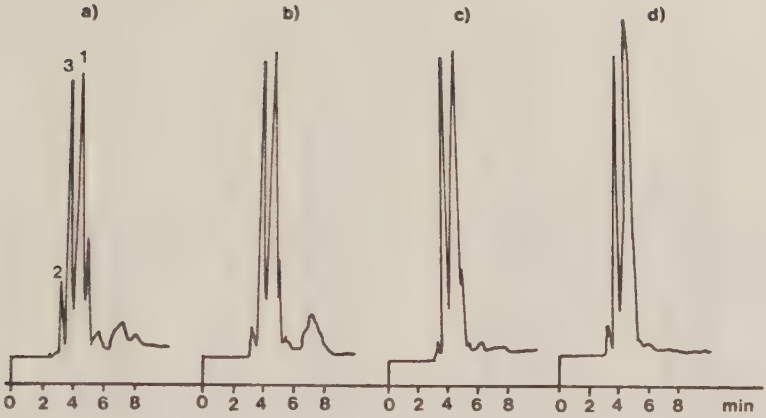


Abb. 52: HPLC einer Mischung von selbsthergestellten Fluidextrakten aus Anis-, Fenchel-, Kümmel-, Liebstöckel- und Wacholder-Fluidextrakt

Fm: Methanol + Wasser = 85 + 15,
LiChrosorb RP 8 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probenmenge 20 µl,
Detektion:
a) 220 nm c) 240 nm
b) 230 nm d) 250 nm

1 Anethol
2 Anisaldehyd
3 Carvon

HPLC zu 3.1.2

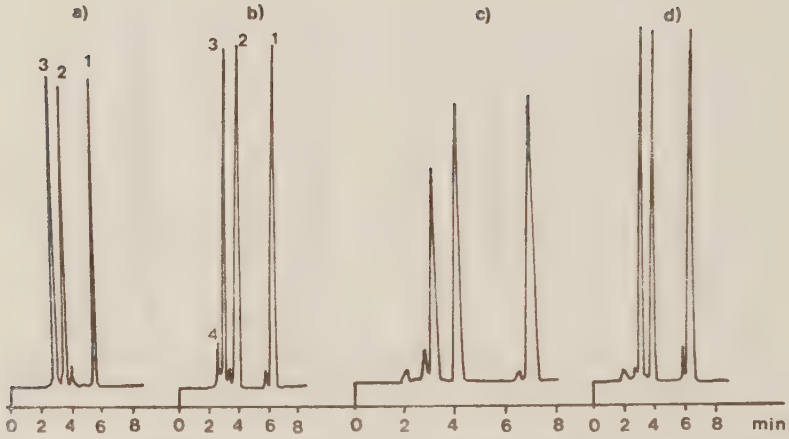


Abb. 53: HPLC einer Terpenmischung aus Anethol 0,1 %, Anisaldehyd 0,2 %, Carvon 0,2 %, Fenchon 1 %, α-Pinen 0,75 % und Umbelliferon 0,4 % in Methanol
Fm: Methanol + Wasser = 85 + 15,
LiChrosorb RP 18 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probenmenge 10 µl,
Detektion:
a) 220 nm c) 240 nm
b) 230 nm d) 250 nm

1 Anethol
2 Carvon
3 Anisaldehyd
4 Fenchon

HPLC zu 3.2.1

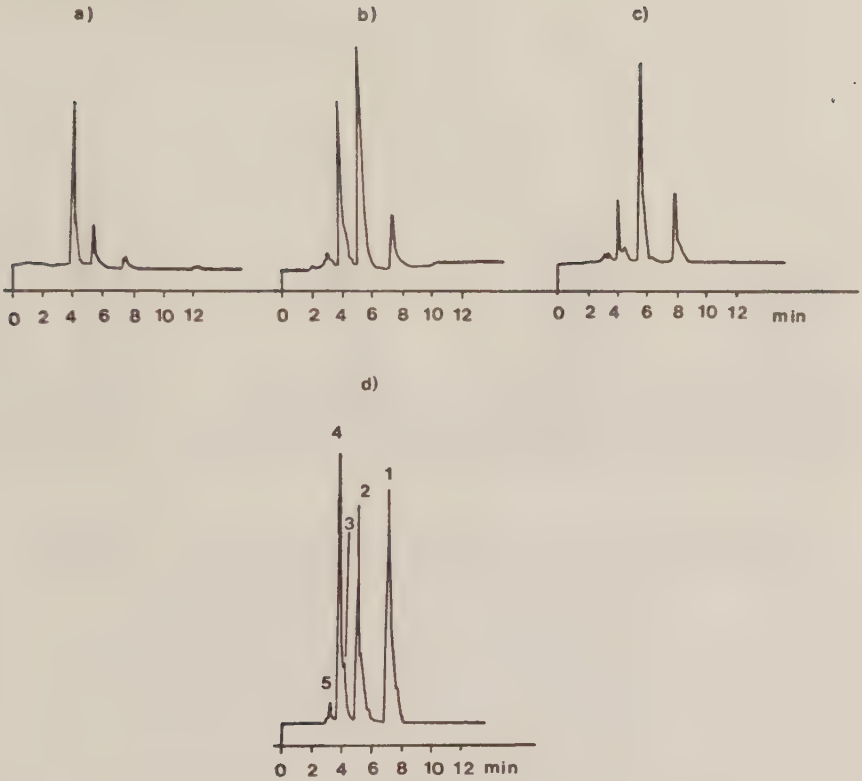


Abb. 54: HPLC einer Terpenmischung aus Anethol 0,1 %, Anisaldehyd 0,2 %, Carvon 0,2 %, Fenchon 1 %, α-Pinen 0,75 % und Umbelliferon 0,4 % in Heptan

Fm: Acetonitril + Wasser = 6 + 4,

LiChrosorb RP 8 7 µm,

Säule 250 x 4 mm,

Fluß 1,0 ml/min,

Probenmenge 10 µl,

Detektion:

a) 220 nm c) 240 nm
b) 230 nm d) 250 nm

1 Anethol
2 Carvon
3 α-Pinen
4 Anisaldehyd
5 Fenchon

HPLC zu 3.2.2

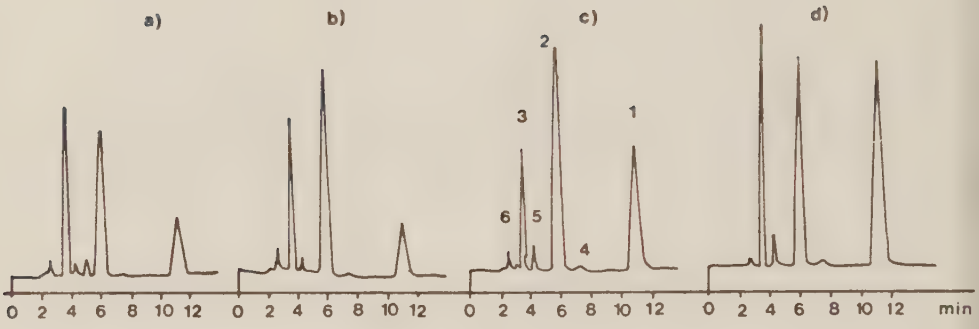


Abb. 55: HPLC einer Terpenmischung aus Anethaol 0,1 %, Anisaldehyd 0,2 %, Carvon 0,2 %, Fenchon 1 %, α-Pinen 0,75 % und Umbelliferon 0,4 % in Heptan

Fm: Acetonitril + Wasser = 6 + 4,
LiChrosorb RP 18 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probenmenge 10 µl,
Detektion:

a) 220 nm c) 240 nm
b) 230 nm d) 250 nm

1	Anethol	4	Fenchon
2	Carvon	5	α-Pinen
3	Anisaldehyd	6	Umbelliferon

HPLC zu 3.2.3

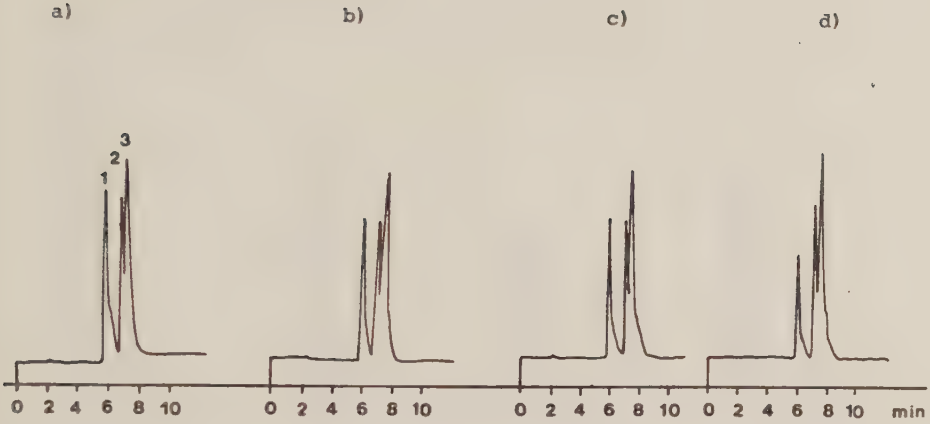


Abb. 56: HPLC einer Mischung von Citral und Piperiton, je 0,1 % in Heptan
Fm: Acetonitril + Wasser = 6 + 4,
LiChrosorb RP 8 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probenmenge 10 µl,
Detektion:
a) 220 nm c) 240 nm
b) 230 nm d) 250 nm

1 Piperiton
2 Geranial
3 Neral
2+3 Citral

HPLC zu 3.2.4

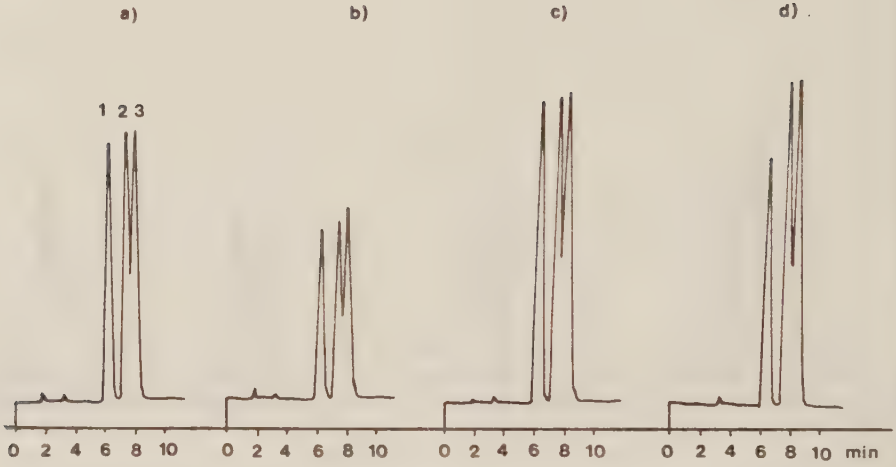


Abb. 57: HPLC einer Mischung von Citral und Piperiton, je 0,1 % in Heptan

Fm: Acetonitril + Wasser = 6 + 4,
LiChrosorb RP 18 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,0 ml/min,
Probenmenge 20 µl,
Detektion:
a) 220 nm c) 240 nm
b) 230 nm d) 250 nm

1 Piperiton
2 Geranial
3 Neral
2+3 Citral

Zu 3.3

Die Linearität des UV-Detektors wurde mit den einzelnen Terpenen überprüft und die lineare Regression $y = mx + b$ bestimmt.

Für m und b gilt:

$$m = \frac{\Sigma x_i y_i - \frac{\Sigma x_i \, \Sigma y_i}{n}}{\Sigma x_i^2 - \frac{(\Sigma x_i)^2}{n}}$$

$$b = \left[\frac{\Sigma y_i}{n} - m \frac{\Sigma x_i}{n} \right]$$

Darüber hinaus wurde noch der Korrelationsfaktor berechnet. Der Korrelationskoeffizient r ist der Wert, der den Grad der Anpassung der gegebenen Punkte an die Gerade der kleinsten Quadrate angibt. Für $r = \pm 1{,}00$ wird die Korrelation als genau angenommen und verdeutlicht eine gute Anpassung an die linerare Regression.

Für r gilt:

$$r = \sqrt{\frac{\left[\Sigma x_i y_i - \frac{\Sigma x_i \, \Sigma y_i}{n} \right]}{\left[\Sigma x_i^2 - \frac{(\Sigma x_i)^2}{n} \right] \left[\Sigma y_i^2 - \frac{(\Sigma y_i)^2}{n} \right]}}$$

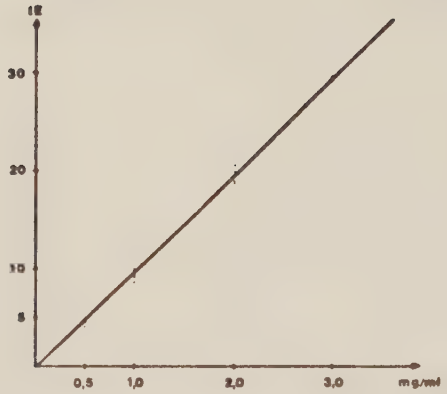


Abb. 58: Linearität des UV-Detektors für Anethol
mit der Gleichung y = 9,788x - 0,053 und
der Korrelation r = 0,9999
IE = Integratoreinheiten

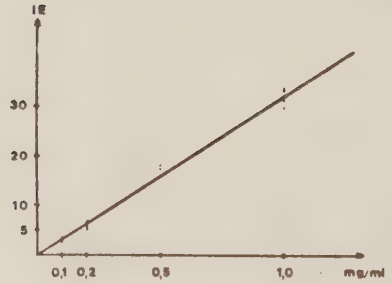


Abb. 59: Linearität des UV-Detektors für Anisaldehyd
mit der Gleichung y = 3,298x - 0,02 und
der Korrelation r = 0,9949

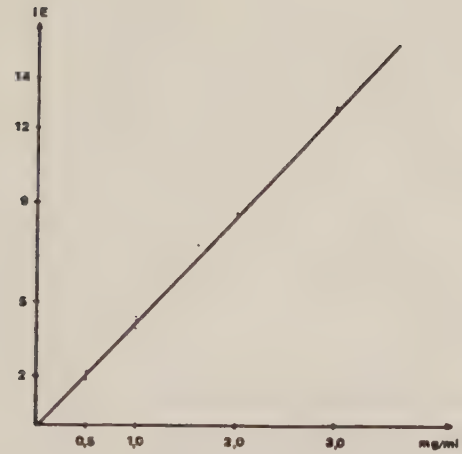


Abb. 60: Linearität des UV-Detektors für Carvon mit der Gleichung y = 4,083x - 0,191 und der Korrelation r = 1,0000

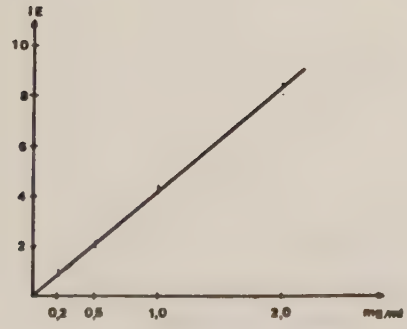


Abb. 61: Linearität des UV-Detektors für Citral mit der Gleichung y = 4,343x + 0,042 und der Korrelation r = 0,9998

Abb. 62: Linearität des UV-Detektors für Fenchon mit der Gleichung y = 3,62x - 0,041 und der Korrelation r = 0,9951

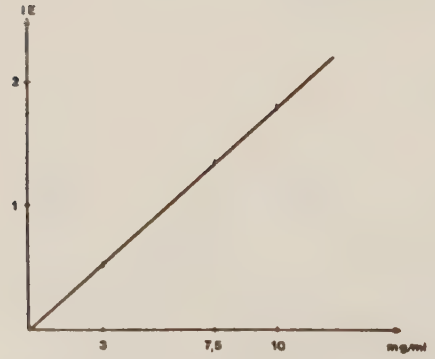


Abb. 63: Linearität des UV-Detektors für α-Pinen mit der Gleichung y = 1,837x - 0,033 und der Korrelation r = 0,9999

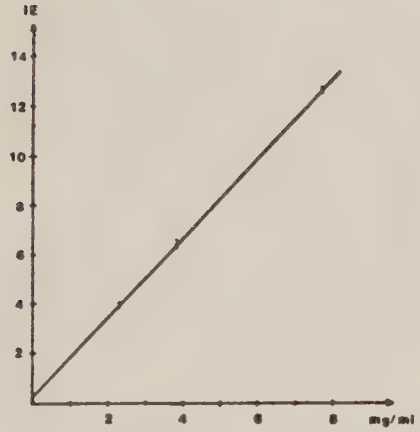


Abb. 64: Linearität des UV-Detektors für Phthalsäuredibutylester mit der Gleichung y = 1,603x + 0,362 und der Korrelation r = 1,0000

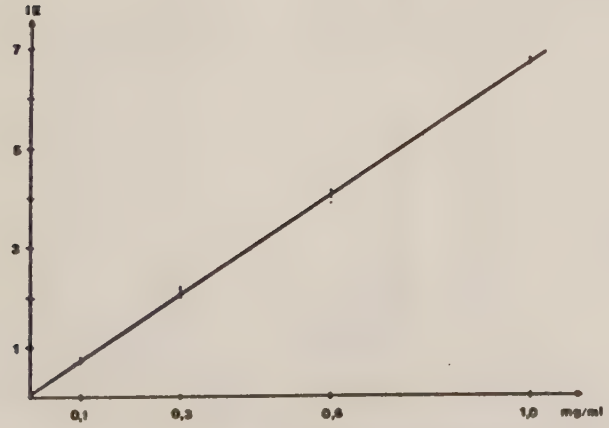


Abb. 65: Linearität des UV-Detektors für Umbelliferon mit der Gleichung y = 6,711x + 0,037 und der Korrelation r = 0,9999

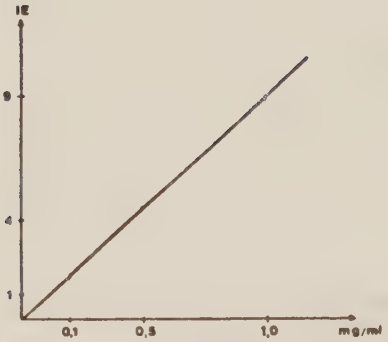


Abb. 66: Linearität des UV-Detektors für Pipertion mit der Gleichung y = 9,17x - 0,072 und der Korrelation r = 1,0000

Zu 3.3

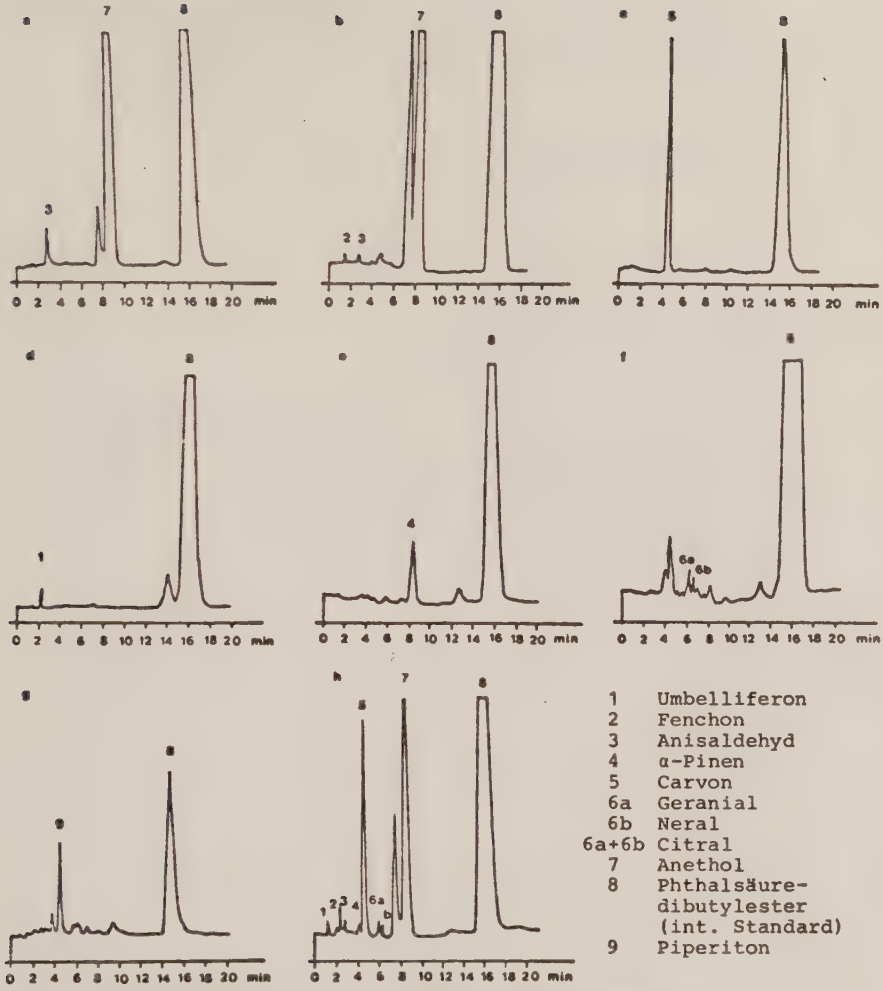


Abb. 67: HPLC von a) Anis-, b) Fenchel-, c) Kümmel-, d) Liebstökkel-, e) Wacholder-Fluidextrakt, f) Melissen-, g) Pfefferminz-Spissumextrakt, h) einer Extraktmischung aus a-f

Fm: Acetonitrol + Wasser = 6 + 4,
LiChrosorb RP 18 7 µm,
Säule 250 x 4 mm,
Fluß 1,4 ml/min,
Probemenge 20 µl,
Detektion: 230 nm

Quantitative Auswertung der Chromatogramme

Die Auswertung erfolgte mittels Integrator hp 3390 A.
Die Gehalte errechnen sich zu:

$$\%_{Terpen} = \frac{F_T \cdot A \cdot 100}{F_S \cdot E} \cdot f_{Terpen}$$

$$f_{Terpen} = \frac{B \cdot F_S}{A \cdot F_T}$$

Es bedeuten:

A = Menge des Standards in mg
B = Menge des Terpens in mg
E = Menge des Extrakts in mg
F_S = Fläche des Standards in IE (Integratoreinheiten)
F_T = Fläche des Terpens in IE

Für die Überlassung eines eigen erstellten Computerprogramms zur Berechnung danke ich Herrn Apotheker B. Roth, Pharmazeutisches Institut, Tübingen, herzlich.

Tab. 12: Für die quantitativen Bestimmungen verwendete Korrekturfaktoren (interner Standard: Phthalsäuredibutylester 3,8435 mg)

Terpen	Faktor
Anethol	1,1167
Anisaldehyd	1,4824
Carvon	0,4917
Citral	0,3127
Fenchon	943,0466
α-Pinen	163,6408
Piperiton	11,1292
Umbelliferon	1,3326
Phthalsäuredibutylester	0,8353

Die reziproke Empfindlichkeit ist diejenige Konzentration, die ein Signal ergibt, das einer Extinktion von 0,0044 (≙ 1 % Absorption) entspricht.

Als Nachweisgrenze (NG) wird der niedrigste Konzentrationswert, den das gegebene Analysenverfahren überhaupt liefern kann, nach folgender Formel berechnet, angegeben:

$$NG = \bar{x}_r + 3s_r$$

$\bar{x}_r$ = Mittelwert des Rauschens
s_r = Standardabweichung des Rauschens

Tab. 13: Reziproke Empfindlichkeit und Nachweisgrenze für die Leitsubstanzen

Inhaltsstoff	reziproke Empfindlichkeit [µg/g]	Nachweisgrenze [µg/g]
Anethol	0,454	0,0098
Anisaldehyd	1,420	0,0130
Carvon	1,189	0,0043
Citral	0,966	0,0027
Fenchon	1,218	8,2884
α-Pinen	2,409	1,4382
Piperiton	0,522	0,0978
Umbelliferon	0,621	0,0117
Phthalsäuredibutylester	2,466	0,0073

Chemikalien, die für die Destillation verwendet wurden:

n-Heptan rein, Fa. Riedel de Haen
Natriumchlorid, Fa. Merck
Xylol, Fa. Merck

Für die DC und HPLC wurden folgende Lösungsmittel verwandt:

Acetonitril, Fa. Riedel de Haen
Ameisensäure, Fa. Merck
Benzol, Fa. Merck
Chloroform, Fa. Merck
Dichlormethan, Fa. Merck
Diethylether, Fa. Merck
Essigsäure 99 % min., Fa. Merck
Ethylacetat, Fa. Merck
Methanol, Fa. Merck
Toluol, Fa. Merck
Bidestilliertes Wasser

Als Vergleichssubstanzen für die DC und HPLC wurden verwandt:

Cineol, Fa. Merck
Citral, Fa. Roth
Citronellal, Fa. Roth
Citronellol, Fa. Roth
Carvon, Fa. Roth
Fenchon, Fa. EGA-Chemie
Geraniol, Fa. EGA-Chemie
Anisaldehyd, Fa. Merck
Anethol, Fa. Roth
Cumarin, Fa. Merck
Limonen, Fa. Roth
Menthol, Fa. Dragoco
Menthylacetat, Fa. Roth
Menthofuran, Fa. Roth
Menthon, Fa. Roth
Piperiton, Fa. Riedel de Haen
α-Pinen, Fa. Roth
α-Terpineol, Fa. Roth
Phthalid, Fa. EGA-Chemie
Phthalsäure-dibutylester
Phthalsäure-diethylester, Fa. Merck
Valepotriat-gemisch, Fa. Kali-Chemie
Umbelliferon, Fa. Roth

Für die Sprühreagenzien wurden folgende Chemikalien verwendet:

Anisaldehyd, Fa. Merck
Antimon(III)-chlorid, Fa. Merck
2,4-Dinitrophenylhydrazin, Fa. Merck
Molybdatophosphorsäure, Fa. Merck

6 LITERATURVERZEICHNIS

1) K.-A. Kovar und D. Friess, Arch.Pharm. 313, 416 (1980)
2) D. Friess, Dissertation, Tübingen 1978
3) A. Sakmann, Dissertation, Tübingen 1981
4) K.-A. Kovar und A. Sakmann, J.Chromatogr. 247, 356 (1982)
5) Europäisches Arzneibuch, Band III, 1978
6) Deutsches Arzneibuch, 8. Ausgabe, 1978
7) Arzneibuch der DDR, 2. Ausgabe, Band VI, 1975
8) Deutscher Arzneimittelcodex, 2. Ausgabe, 1979
9) F. Wartmann-Hafner, Pharm.Acta Helv. Vol. 41, 417 (1966)
10) E. Stahl und W. Schild, Arzneim.Forsch. 19, 314 (1969)
11) V. Kuhlhanek, B.K. Pater und B. Siegfried, Schweiz. Apoth.Ztg. 110, 875 (1972)
12) E. Graf und B. Bornkessel, Dtsch.Apoth.Ztg. 118, 503 (1978)
13) E. Stahl, Chromatographische und mikroskopische Analyse von Drogen, G. Fischer-Verlag, Stuttgart, 1970
14) O. Moritz, Arch.Pharm. 276, 372 (1938)
15) H. Hein, in: Angewandte Chromatographie, Bodenseewerk Perkin Elmer & Co. GmbH, Überlingen, 1975
16) H. Wagner, Pharmazeutische Biologie, Band 2, G. Fischer-Verlag, Stuttgart, 1980
17) R. Kaiser, Chromatographie in der Gasphase, Band IV, Bibliographisches Institut, Mannheim, 1965
18) B. Welz, Atomabsorptionsspektroskopie, 2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim, 1976
19) H. Kaiser, Z.Anal.Chem. 209, 1 (1965)
20) Deutsches Arzneibuch, 6. Ausgabe, 1926

Lebenslauf

Ich wurde am 19.8.1950 in Göppingen als einziges Kind des Friedrich Bock, Oberregierungsdirektor i.R. und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Pöhler, geboren.

Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Grundschule in Fellbach, von 1961 bis Oktober 1963 das Friedrich-Schiller-Gymnasium in Fellbach und von Oktober 1963 bis Juni 1970 das Gymnasium Schorndorf, wo ich am 11. Juni 1970 das Abitur ablegte.

Ab 1. August 1970 war ich Apothekerpraktikant in der Apotheke in Grunbach/Rems. Am 15. Juni 1972 bestand ich die Pharmazeutische Vorprüfung in Stuttgart.

Vom 1.1.1973 bis 31.3.1974 leistete ich den Grundwehrdienst bei der Bundeswehr ab.

Von April 1974 bis März 1976 war ich in verschiedenen öffentlichen Apotheken tätig.

Mit dem Sommersemester 1976 begann ich das Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen und habe am 7.9.1978 den 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und am 3.9.1979 den 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung bestanden. Die Approbation als Apotheker besitze ich seit 30.10.1979.

Im Januar 1980 begann ich bei Professor Dr. K.-A. Kovar die vorliegende Arbeit, die ich im November 1982 abschloß.

Ab Januar 1980 war ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut Tübingen angestellt. Seit April 1981 bin ich als wissenschaftlicher Angestellter tätig.

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Professor Dr. K.-A. Kovar waren die Herren Professoren und Dozenten:

H.P.T. Ammon (Pharmokologie)
H. Auterhoff, J.E. Schultz (Pharm. Chemie)
R.E. Bader (Hygiene, Mikrobiologie)
E. Graf, H. Hamacher (Pharm. Technologie)
M. Hanack (Organ. Chemie)
E. Reinhard (Pharm. Biologie)
H. Seiler (Physik)

D. GRÄBNER
DISSERTATIONS U. OFFSETDRUCKEREI

Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon 09545 / 8791